Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROGNOSTISCHEN BEDEUTUNG VON ROSETTENINHIBITIONSFAKTOR (RIF) UND SERUMINHIBITIONSFAKTOR (SIF) BEI AKUTER UND CHRONISCHER HEPATITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Grauer
aus Reutlingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. H. D. Waller

UNTERSUCHUNGEN ZUR PROGNOSTISCHEN BEDEUTUNG VON ROSETTENINHIBITIONSFAKTOR (RIF) UND SERUMINHIBITIONSFAKTOR (SIF) BEI AKUTER UND CHRONISCHER HEPATITIS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Wolfgang Grauer
aus Reutlingen

1983

Dekan: Professor Dr. D. Plester
1. Berichterstatter: Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Dölle

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

ABKÜRZUNGEN

anti-HBc	spezifischer Antikörper gegen Hepatitis B Core Antigen
anti-HBs	spez. Antikörper gegen HBsAg
AVH	Akute Virushepatitis
CAH	Chronisch aggressive Hepatitis
CHE	Cholinesterase
cpm	counts per minute
ER	E-Rosettenbildung; spezifische Bindung von Schafserythrozyten an menschliche T-Lymphozyten
Gamma-GT	Gamma-glutamyl-Transferase
HBeAg	Hepatitis B e Antigen
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
^{3}H-TdR	Tritium markiertes Thymidin
LC	Leberzirrhose
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PHA	Phytohämagglutinin A
RIA	Radioimmunoassay
RIF	Rosetteninhibitionsfaktor
SGOT	Serumglutamat-oxalazetat-transaminase
SGPT	Serumglutamat-pyruvat-transaminase
SIF	Seruminhibitionsfaktor; hemmt die PHA induzierte Lymphozytentransformation

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. P. A. Berg an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen Abteilung II, die von Herrn Prof. Dr. H. D. Waller geleitet wird.
Die Untersuchungen wurden mit Hilfe eines Stipendiums der Studienstiftung des deutschen Volkes durchgeführt.

Herrn Prof Berg danke ich besonders für die Anregung zu diesem Thema, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie ständige Diskussionen und Ermutigung.

Herrn Dr. N. Brattig möchte ich als zweiten Vater dieser Arbeit bezeichen. Ohne seine detailierten methodischen Kenntnisse und seine ständige Ansprechbarkeit und Geduld ist ihre Entstehung nicht denkbar.

Weiterhin möchte ich danken:

Herrn E. Stechemesser für Beratung in biochemischen Fragen

Herrn Priv. Doz. Dr. Schomerus und Herrn Dr. Wiedmann sowie Herrn Priv. Doz. Dr. Flemig für die Überlassung von Seren

Herrn P. Lehmann für theoretische Anregung

den Mitarbeitern des immunpathologischen Labors Prof. Berg für ihre Hilfsbereitschaft

Frau M. Dürnay und Frau L. Deutschle für photographische Arbeiten

UNIV. LEIDEN BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Patienten und Kontrollpersonen

2.1 Kontrollpersonen

2.2 Patienten mit akuter Virushepatitis

2.3 " " chronischen Hepatitiden

2.4 " " sonstigen Leberkrankheiten

2.5 " " anderen Krankheiten

3. Material und Methoden

3.1 Klinisch-chemische und virologische Bestimmungen

3.2 Präparation der PBMC

3.3 Bestimmung von RIF
3.3.1 Lymphocytenkultur
3.3.2 Waschen der Lymphocyten nach Kultur
3.3.3 E-Rosettentest, Statistik

3.4 Bestimmung von SIF, Statistik

3.5 Serumfraktionierung
3.5.1 Dichtegradientenultrazentrifugation
3.5.2 Immunelektrophorese
3.5.3 Lipoproteinelektrophorese
3.5.4 Radiale Immundiffusion (Ouchterlony)

4. Ergebnisse

4.1 Biochemische Charakterisierung

4.2 Ergebnisse bei Patienten mit akuter Virushepatitis (AVH)
4.3 RIF und SIF im Verlauf der AVH

4.4 " " " bei CAH

4.5 " " " bei sonstigen Leberkrankheiten

4.6 " " " bei sonstigen Erkrankungen

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

8. Lebenslauf

1.EINLEITUNG

Pro Jahr treten in der Bundesrepublik Deutschland 20 000 gemeldete Fälle von akuter Virushepatitis auf. Die Tendenz ist steigend. Die Dunkelziffer wird auf 100 000 geschätzt (88). Bisher war gegenüber der verschiedenen Hepatitisformen eine aktive Immunprophylaxe nicht möglich; dies ist für die Hepatitis B seit jüngster Zeit der Fall.
Im Gegensatz zur akuten Hepatitis A, wo längere chronische Verläufe nicht bekannt sind, gehen ca. 5 - 10 % der akuten Hepatitis B und ein nicht genau bekannter Teil der akuten Hepatitis NONA NONB in eine chronische Erkrankung über (88). Nach klinischen, biochemischen und histologischen Kriterien werden üblicherweise die protrahierte Hepatitis (Transaminasenerhöhung länger als 4 Monate nach akutem Beginn), die chronisch persisierende Hepatitis (histologisch Persistenz von milden Entzündungszeichen ohne Zeichen des Umbaus der Leberarchitektur, nur geringe oder keine Transaminasenerhöhung), und die chronisch aktive (aggressive) Hepatitis (biochemisch meist deutlich erhöhte Transaminasen, erhöhte Gammaglobulinfraktion, histologisch Zeichen weiterbestehender Entzündung mit Umbau der Leberarchitektur; Zeichen einer mehr oder weniger ausgeprägten Leberzirrhose in späteren Stadien). Relevant ist diese Einteilung vor allem für eine eventuelle Therapie und zur Einschätzung der Prognose. Im Falle der Hepatitis B stehen zusätzlich virusserologische Parameter zur Verfügung; so gilt die Persistenz von HBsAg und insbesondere HBeAg in der klinischen Routine als ungünstig (88). Das Fehlen von anti-HBs und anti-HBe wird als Zeichen einer nicht erfolg-

reichen immunologischen Auseinandersetzung mit dem Hepatitisvirus gewertet (allerdings kann die Serokonversion von HBeAg zu anti-HBE auch den Übergang zur Leberzirrhose bezeichnen (88). Anti-HBc-IgM, DNA-Polymerase und HBeAg werden als Zeichen fortdauernder Virusreplikation gesehen. Insgesamt gesehen lassen die virologischen Parameter, die für die wahrscheinlich heterogene Gruppe der Hepatitis NONA NONB noch nicht allgemein verfügbar sind, eine befriedigende prognostische Aussage auch nicht zu. Sie geben lediglich Auskunft über den Stand der Virusinfektion. Die Leber scheint jedoch weniger durch Viruseinwirkung direkt geschädigt zu werden, als durch die Reaktion der Immunabwehr gegen das infizierte oder postinfektiös veränderte Organ (83, 49a). So können einerseits immunologisch stark reagierende Personen trotz sehr effektiver Viruselimination am massiven Leberzelluntergang sterben (fulminante Verlaufsform), andererseits schwach reagierende Personen, die zur Viruselimination nicht in der Lage sind, trotz grosser Mengen virusassoziierten Materials in den Leberzellen klinisch gesund bleiben und histologisch höchstens geringe Entzündungszeichen zeigen (assymptomatische HBsAg- Träger). Die genetisch determinierte Immunantwort bestimmt wohl zum grössten Teil, ob die Virushepatitis fulminant verläuft, nach einer akuten Phase normal ausheilt, oder protrahiert oder chronisch mit mehr oder weniger starker entzündlicher Aktivität fortschreitet. Es sind daher zahlreiche Parameter der Immunantwort bei Patienten mit Virushepatitis gemessen worden und es wurde versucht, diese mit bestimmten Verlaufsformen zu korrelieren (16, 22, 23, 25, 27, 28, 38, 46, 49a, 59, 83, 94, 108, 110, 129).

Von besonderem praktischen Interesse erscheinen aus technischen Gründen solche Parameter der Immun-

antwort, die nicht auf Patientenzellen angewiesen sind, sondern mit Serum auskommen. Chisari et al. beschrieben 1973 erstmals einen Faktor im Serum von Patienten mit akuter Virushepatitis B (22), der bei Ausheilung verschwand. Bei chronisch aktiven Hepatitiden konnte der Faktor ebenfalls nachgewiesen werden, nicht aber bei chronisch persistierenden oder ander Leberkrankheiten sowie extrahepatischen Virusinfektionen. Der Faktor hemmte die für menschliche T-Lymphozyten spezifische Fähigkeit, mit Schafserythrozyten spontan Rosetten zu bilden (E-Rosettierung, 73) und wurde Rosette Inhibitory Faktor (RIF) genannt. Er wurde als ein atypisches Lipoprotein der LDL-Klasse charakterisiert (22). Die Autoren vermuteten eine Korrelation der Persistenz von RIF mit chronischen Verlaufsformen.

Eine von RIF unabhängige immunsuppressive Serumaktivität, die die mitogeninduzierte Lymphoztentransformation hemmt, war schon früher von mehreren Autoren bei Hepatitis, aber auch einer Reihe anderer infektiöser autoimmuner und neoplastischer Krankheiten beschreiben worden (91 - 94). Brattig und Berg (16) charakterisierten den bei Leberkrankheiten vorkommenden Faktor als ein mit Albumin oder Alphaglobulinen assoziiertes Molekül mit einem Molekulargewicht mit Antiaktivatoreigenschaft. Sie nannten den Faktor SIF (= Seruminhibitionsfaktor). Es wurde vermutet, daß die Persistenz von SIF prognostisch ungünstig ist bzw. bei chronischen Hepatitiden eine hohe Krankheitsaktivität anzeigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung beider Faktoren zur Beurteilung der Prognose akuter und chronischer Hepatitiden zu evaluieren.

3. PATIENTEN UND KONTROLLPERSONEN

3.1 Kontrollpersonen

Die in den Tests verwendeten Lymphozyten stammten von 14 klinisch gesunden Personen (7 Frauen und 7 Männer, Labor und -Klinikpersonal) im Durchschnittsalter von 30.4 ± 7.5 Jahren. Eine Person hatte eine akute Virushepatitis B vor 6 Jahren komplikationslos durchgemacht und war anti-HBs positiv. Alle anderen zeigten anamnestisch und serologisch keinen Anhalt für eine Hepatitis A oder B -Infektion.
Die Kontrollseren stammten von den gleichen Personen. Zusätzlich wurde als Kontrolle Seromed^{R} Human Serumpool, Chargennummer 80320 verwendet.

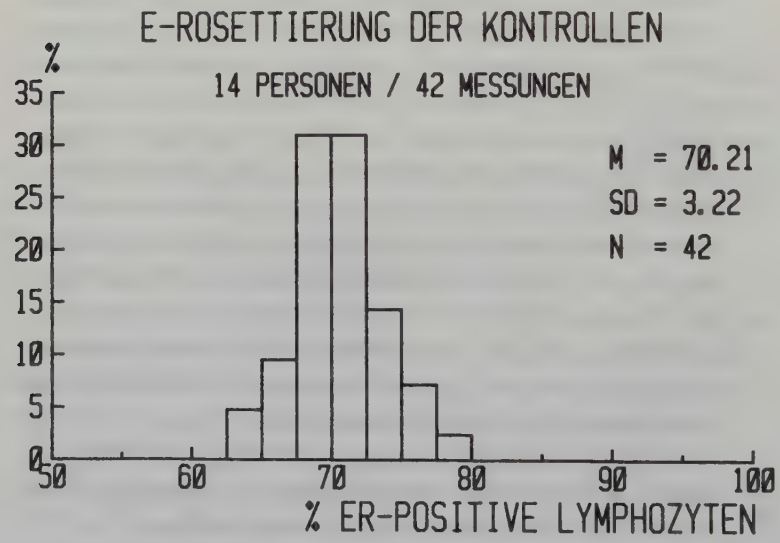


Abb. 1: Erbebnisse des E-Rosettentests bei den 14 Kontrollpersonen (Histogramm).

3.2 Patienten mit akuter Virushepatitis

122 Seren von 30 Patienten mit akuter Virushepatitis (AVH) wurden verlaufsmässig über 8 - 24 Wochen untersucht. Abb. 1 zeigt die Verteilung der Virustypen. Die Diagnose basierte auf den üblichen klinischen, biochemischen und serologischen Kriterien. Die folgenden Parameter wurden erfasst: SGOT, SGPT, gamma-GT, Alkalische Phosphatase, gesamt Bilirubin, Cholinesterase, Quick, Gesamteiweiss, Serumelektrophorese, anti-HAV, HBsAg quantitativ. Die Hepatitisserologie wurde von Prof. Frösner (Max v. Pettenkofer Institut, München) durchgeführt.

AETIOLOGIE DER AKUTEN HEPATITIS

N = 30

	N	%
HEPATITIS A	3	10
HEPATITIS B	27	80
HEPATITIS NONA NONB	3	10

Abb. 2: Aetiologie bei 30 Patienten mit AVH

3.3 Patienten mit chronischen Hepatitiden

Seren von 101 Patienten mit der Diagnose "chronisch aggressive Hepatitis" (CAH) wurden einzeitig untersucht. Entscheidend war die Leberhistologie: In den meisten Fällen (68 %) lautete die histologische Diagnose "CAH 2b", der Rest war als CAH mittleren bis hohen Aktivitätsgrades eingestuft. In allen Fällen waren einer oder mehrere der folgenden Befunde beschreiben: Deckplatteneinbrüche, Brückennekrosen, periportale Faservermehrung, periportale lymphoplasmazelluläre Infiltration, beginnender Strukturumbau. Bei 12% wurde eine beginnende Zirrhose beschrieben. 65 % der Patienten waren Frauen, das Durchschnittsalter lag bei 45.7 $\pm$ 7.9 Jahren (16 - 76 Jahre). Die virusserologischen Befunde zeigt Abb. 3:

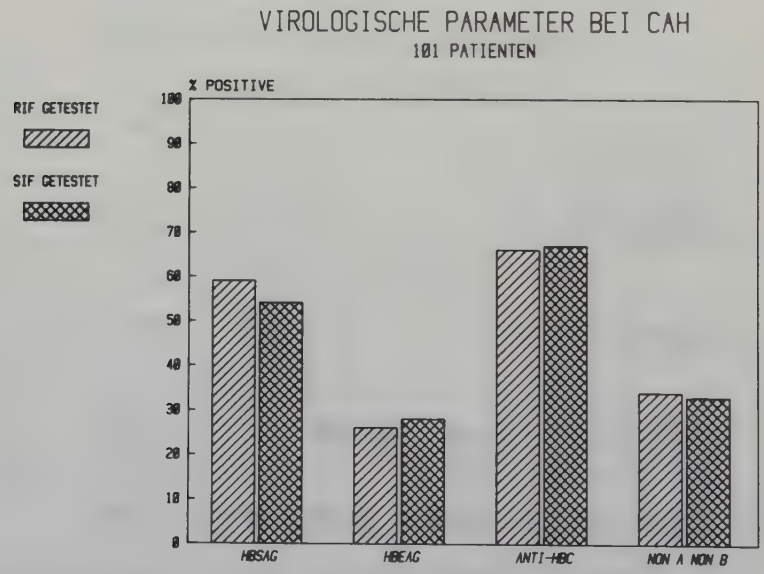


Abb. 3: Virolog.Parameter bei 101 Patienten mit CAH.

Bei den 26 untersuchten Patienten mit der Diagnose chronisch persistierende Hepatitis lag ebenfalls mindestens ein histologischer Befund vor. In jedem Fall war eine akute Hepatitis innerhalb von 1 bis 3 Jahren vor der Untersuchung bekannt. 66.4% waren Frauen, das Durchschnittsalter lag bei 43 ± 6.4 Jahren (20 - 62 Jahre). 60 % der Patienten hatten HBsAg, 28 % HBeAg, und 69 % anti-HBc. 31 % zeigten keinerlei Marker einer HBV-Infektion.

3.4 Patienten mit sonstigen Leberkrankheiten

Seren von 22 Patienten mit der klinisch eindeutigen Diagnose Leberzirrhose (LC) wurden einzeitig untersucht. Histologien lagen nicht in allen Fällen vor. Eine Leberkrankheit war seit mindestens 6 Jahren bekannt. In keinem Fall war eine akute Virushepatitis anamnestisch zu vermuten. Ein Patient war anti-HBs positiv, alle anderen zeigten keine Zeichen einer Hepatitis B Infektion. Bei allen Patienten wurde Alkohol als Ursache der Leberzirrhose vermutet.

Bei den 17 untersuchten Patienten mit primär biliärer Zirrhose (PBC) beruhte die Diagnose neben dem Ergebnis der Leberhistologie auf dem wiederholten Nachweiss hochtitriger antimitochondrialer Antikörper. Eine Patientin war HBsAg positiv, die anderern hatten serologisch keinen Hinweis auf eine durchgemachte Hepatitis B.

Bei 4 der Patienten mit medikamentös bedingter Hepatitis lag eine durch unbeabsichtigte Reexposition gesicherte und im Lymphozytenstimulationstest bestätigte Überempfindlichkeit gegen Oxyphenisatin vor, bei 2 weiteren war eine akute Hepatitis ohne

Anhalt für eine virale Genese im Zusammenhang mit einer Halothannarkose aufgetreten.

3.4 Sonstige Krankheiten

Seren von 7 Patienten mit der klinischen und serologischen Diagnose einer akuten Virusmyocarditits (Cocksackie B), von 5 Patienten mit infektiöser Mononukleose (Epstein Barr Virus) sowie von 9 Patienten mit systemischen Lupus erythematodes (hochtitrige Antikörper gegen native DNA). Die Patienten zeigten mit einer Ausnahme keine Zeichen einer Hepatitis und waren negativ für Marker der Hepatitis A und B. Ein Patient mit Mononukleose hatte leicht erhöhte Transaminasen, die sich im Verlauf rasch zurückbildeten.

Alle Seren wurden bei 56 °C 30 min lang hitzeinaktiviert (dekomplementiert), sterilisiert mittels Filtration durch 0.45 um Millipore Filter und bis zum Test in luftdichten Polyaethylenröhrchen bei -20 °C aufbewahrt.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Klinisch chemische und virologische Bestimmungen

Bei den Patienten mit akuter Virushepatitis wurden SGOT, SGPT, Gamma-GT, CHE, Gesamtbilirubin, Quick, Gesamteiweis im Serum und Serumelektrophorese im Rahmen der klinischen Routine nach den üblichen Methoden bestimmt. Die quantitative Bestimmung von HBsAg mittels einer Modifikation der Laurell Immunelektrophorese (53) wurde von Prof. Frösner (Max v. Pettenkofer Institut, München) durchgeführt, ebenso der RIA auf anti-HAV.
Bei Patienten mit chronischen Leberkrankheiten wurden HBsAg, anti-HBs, anti-HBc (IgG und IgM nicht differenziert) mittels kommerziell erhältlicher RIAs routinemässig bestimmt (ABBOT AUSRIA II, AUSAB, CORAB). HBeAg und anti-HBe wurde mittels radialer Immundiffusion gemessen. Positive Werte für HBeAg bedeuten daher eine hohe Konzentration des Antigens im Serum, da die Immundiffusionsmethode ca. 500 mal weniger empfindlich ist als der Radioimmunoassay.

4.2 Präparation der PBMC (vorwiegend Lymphozyten)

Methode nach Böyum (14), Modifikation der WHO (3)

10 ml steril abgenommenes, venöses Blut, heparinisiert mit 250 I.E. Natriumheparin (Liquemin ^{R}) wurde mit 20 ml Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) vermischt und mit einer sterilen, gestopften Polypropylen Einmalpipette (Falcon) vorsichtig über 20 ml einer Ficoll-Isopaque Lösung (Lymphoprep^{R}) der spez. Dichte 1.077 g/cm^3 geschichtet in einem sterilen 50

ml-Polypropylenröhchen mit V-boden. Dieser Gradient wurde 30 min bei Raumtemperatur mit 400 g zentrifugiert, wobei scharfes Beschleunigen oder Abbremsen der Zentrifuge sorgfältig vermieden wurde. Die dünne Schicht der PBMC an der Grenzfläche zwischen Plasma und Lymphoprep wurde mit einer gestopften Einmalpipette abgesaugt.

Die so erhaltenen Zellen wurden gewaschen durch 4 malige Zentrifugation in je 50 ml HBSS und anschliessend in 10 ml Zellkulturmedium (RPMI 1640) suspendiert.

Zur Bestimmung der Zellzahl und -Vitalität wurden 20 ul dieser Suspension in 180 ul einer 0.0035 % Lösung von Acridinorange (35 ug/ml in physiologischer Kochsalzlösung) gegeben (74) und in einer Neubauer Zählkammer mit kombinierter UV- und Hellfeldbeleuchtung ausgezählt (s. Kapitel 4.3.3). Die Vitalität, bestimmt durch Aufnahme von Acridinorange lag immer über 90 %, typisch über 95 %.

Die Ausbeute, bezogen auf die mittels Leukozytenzahl und Differentialblutbild errechnete Zahl von Lymphozyten variierte stark zwischen den Spendern und lag bei 50 -85 %.

Pro Zellspender wurde ein Ausstrichpräparat der PBMC nach Pappenheim gefärbt und differenziert. 80 - 97 % der Zellen waren morphologisch Lymphozyten, der Rest Makrophagen.

SCHEMA DER RIF BESTIMMUNG

1.KULTUR	normale Lymphozyten	+	Patienten resp. Kontroll–Serum
	18 h Inkubation bei 37 °C		
2.WASCHEN	4 x bei 4 °C		
	Zugabe von SRBC Mixen		
3.ROSETTEN–WÄRMEINKUBATION	5 min 37 °C		
4.ROSETTEN–ZENTRIFUGATION	5 min 4oo g 4 °C		
5.KALTINKUBATION	1.5 bis 4 h bei 2 bis 4 °C		
6.AUSZÄHLUNG	Anteil der rosettenbildenden an der Gesamtlymphozytenzahl		

Abb. 4: Schematische Darstellung der Technik des Rosetteninhibitionstests. Erläuterungen s. Text.

4.3 Bestimmung von RIF

4.3.1 Zellkultur

Die Methode basiert auf der von Chisari und Edginton beschriebenen (21 - 28).
10^5 PBMC eines gesunden Spenders, suspendiert in 100 ul RPMI 1640, supplementiert mit Glutamin (2 mM), Penicillin (100 I.E./ml) und Streptomycin (100 ug/ml) wurden zusammen mit 25 ul Patienten- oder Kontrollserum in flachbödigen Mikrotiterplatten 18 h lang bei 37 °C in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre, angereichert mit 5 % CO_2, inkubiert.
Wenn Serumfraktionen getestet wurden, wurde zu den Fraktionen 20 ul Normalserum gegeben, um Proteinmangel auszuschliessen.
Pro Mikrotiterplatte wurden 2 Kontrollseren und 10 Patientenseren verwendet, da sich eine grössere Menge nicht innerhalb methodisch tolerabler Zeit verarbeiten ließ. Jeder Ansatz wurde dreifach ausgeführt.

4.3.2 Waschen der Kulturen
(Abb.4, Punkt b)

Im Anschluß an die 18 h Wärmeinkubation (Punkt a der Abb. 4) wurde das Test- oder Kontrollserum aus den Ansätzen gewaschen. Dazu wurden die Überstände mit einer einstellbaren Mikropipette bis auf 40 ul abgehoben und sofort mit 200 ul RPMI 1640 wieder aufgefüllt. Dieser Schritt erwies sich als kritisch, da bei Verzögerung der Flüssigkeitszugabe nach dem Abheben des Überstandes die Zellvitalität rasch absinkt. Die Verwendung von Mikrotiterplatten mit V- förmigen Vertiefungen, wie von Chisari beschrieben

(22), erwies sich als nicht vorteilhaft, weil wegen des geringeren Volumens dieser Platten mehr Waschgänge erforderlich waren und weil durch die Übertragung auf eine andere Platte Zellen verloren gingen. Die Mikrotiterplatten wurden sodann 2 min bei 4 °C mit 2oo g zentrifugiert und der Vorgang 3 mal wiederholt. Arbeiten auf Eis und Zentrifugation in der Kälte ergab deutlich bessere Expression von rosettenhemmender Aktivität, verglichen mit sonst gleichem Vorgehen bei Raumtemperatur. Lange Bearbeitungszeiten führten zu verminderter Empfindlichkeit.

4.3.3 Rosettentest (22, 73, 74, 77)
(Abb. 4, Punkte c - e)

Nach der 4. Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 50 ul abgehoben und das gleiche Volumen einer 1 % (Vol/Vol) Suspension gewaschener Schafserythrozyten sofort dazu pipettiert. Diese waren zuvor folgendermaßen vorbereitet worden:
10 ml Behring Hammelblut^{R} wurden 4 mal mit 4o ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Volumen der dicht gepackten Erythrozyten wurde mit einem Messglas bestimmt und eine 1 % Suspension durch Zugabe des 100 fachen Volumens RPMI 1640 hergestellt. Die Relation PBMC : SRBC lag bei 1 : 80 bis 1 : 100 (29).
Nach Zugabe der SRBC wurde die Mikrotiterplatte 20 sek auf einem Mikrotitermixer (Titertek^{R}) gemischt und anschliessend im Brutschrank 6 min lang bei 37° inkubiert. Die Dauer dieser Phase hatte sich in Vorversuchen als kritisch erwiesen (Abb. 5):

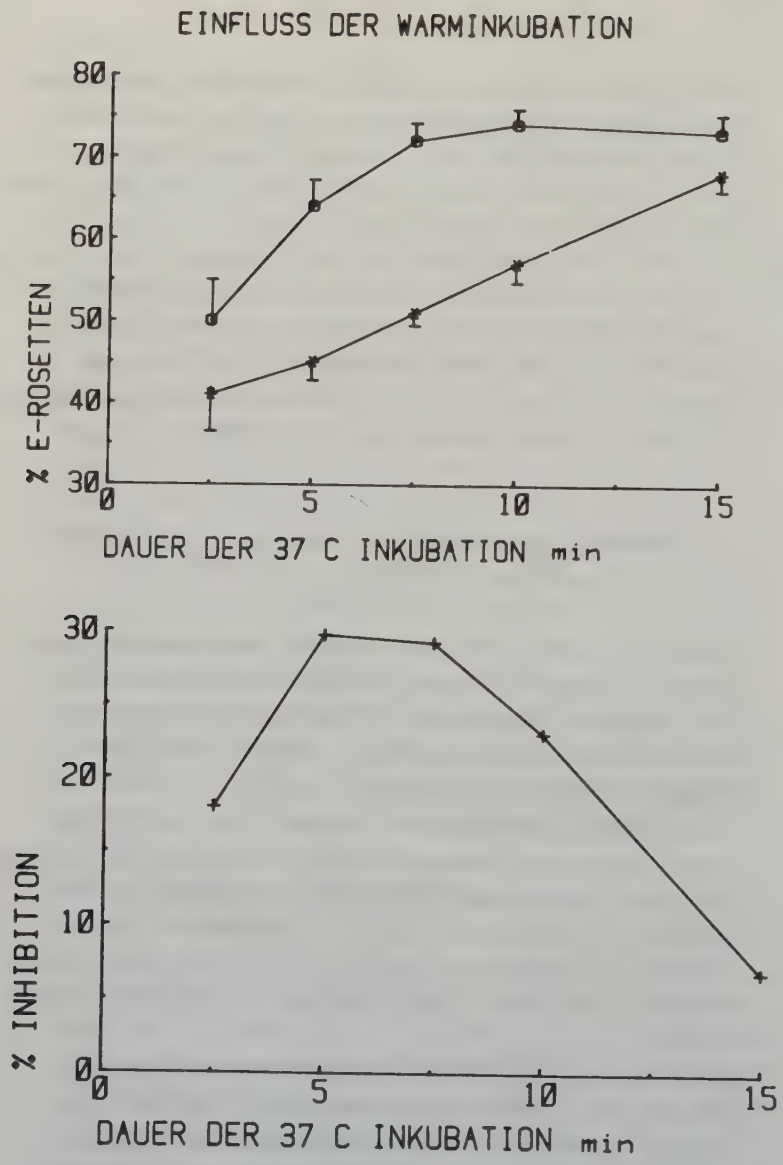


Abb. 5: Einfluß der Dauer der Wärmeinkubation von SRBC mit seruminkubierten Lymphozyten auf Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit des Rosettentests. Erläuterungen s. Text.

Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt die Rosettenbildung auch im gehemmten Ansatz stark an (Abb. 5 a), die Empfindlichkeit des Test sinkt (Abb. 5 b). Sehr kurze Inkubationszeiten lassen hingegen auch die Rosettenbildung im Kontrollansatz zurückgehen (Abb. 5 a), zusätzlich sinkt bei sehr kurzen Zeiten die Reproduzierbarkeit.
In allen Tests mit Patientenseren oder Serumfraktionen wurden daher 5 min Wärmeinkubation angesetzt.

4.3.3 Rosetten- Zentrifugation und Kälteinkubation

Sofort nachdem die Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank genommen wird, wird sie mit Mikrotiter Sealing Tape^{R} (Cooke) versiegelt und 5 min bei 4 ^{o}C zentrifugiert (Abb.4 c). Zentrifugation bei Raumtemperatur brachte deutlich schlechtere Expression rosettenhemmender Aktivität und verursachte vermehrte Bildung von Clustern, die beim Auszählen stören.
Im Anschluß an die Zentrifugation werden die Ansätze bei 2 - 4 ^{o}C in der Klimakammer inkubiert. Es hatte sich bei Vorversuchen gezeigt, daß die Inkubation auf Eis durch Beeinträchtigung der Zellvitalität zu schlechteren Ergebnissen führt. Die Inkubation in stark vibrierenden Kühlschränken hat sich ebenso als ungünstig erwiesen. Die Dauer der Kaltinkubationsperiode erwies sich als kritisch: Zu kurze Zeiten ergaben sehr geringe Rosettierung im gehemmten wie im ungehemmten Ansatz und führte zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Mit zunehmender Dauer stieg die Rosettierung im gehemmten Ansatz stärker als im Kontrollansatz, was zu geringer Empfindlichkeit führte. Abb. 6a zeigt den Einfluß der Kälteinkubationsdauer auf die E-Rosettierung in gehemmten wie ungehemmten Ansätzen (Mittelwerte

aus je 3 Versuchen $\pm$ 1 S). Abb. 6b zeigt Auswirkung auf den (daraus errechneten) Inhibitionsindex und somit auf die Testempfindlichkeit.
Als Standarddauer der Kälteinkubationsperiode wurden 1.5 bis 4 h angesetzt, da in diesem Bereich die Empfindlichkeit noch gut war bei guter Reproduzierbarkeit.

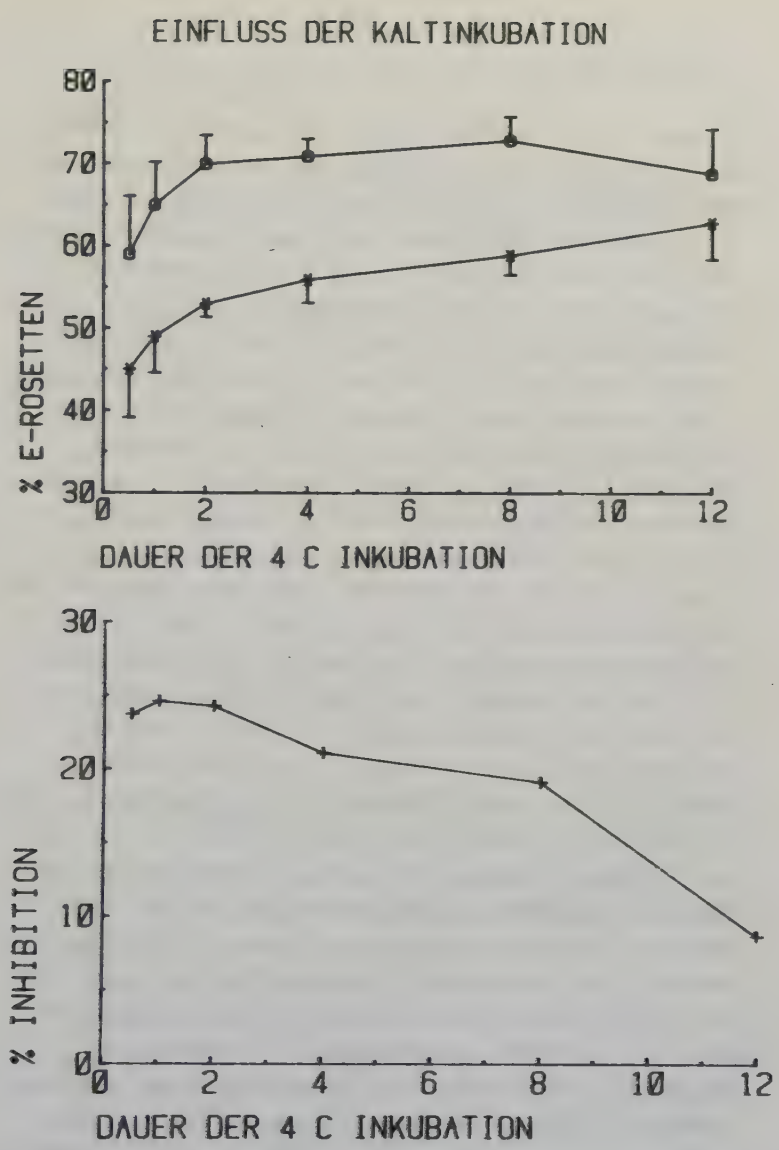


Abb. 6: Einfluss der Rosettenkälteinkubationsdauer auf den Inhibitionsindex. Erläuterungen s. Text.

4.3.4 Auszählung

Im Anschluß an die Kaltinkubation wurde der Anteil rosettierender Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl bestimmt. Dazu wurde die Mikrotiterplatte auf Eis gelegt, die Folie über der jeweiligen Vertiefung aufgeschnitten und 5o ul einer Acridinorangelösung (35 ug/ml Acridinorange in NaCl 0.9%, (71)) in die Vertiefung gegeben. Die Zellen wurden durch sehr vorsichtiges, genau 5 maliges Ansaugen und Ausblasen durch eine weitlumige Einmalpipettenspitze resuspendiert. Die Suspension wurde in eine Neubauer Zählkammer gegeben und unter einem Leitz Orthoplan Mikroskop ausgezählt (Objektiv 40 x, Okular 12 x). Es wurde eine doppelte Beleuchtung verwendet (71): Hellfeldbeleuchtung geringer Intensität (Beleuchtungseinstellung nach Köhler) plus UV-Auflicht (Filter). 200 vitale Lymphozyten pro Vertiefung wurden ausgezählt und der Anteil rosettenbildender Lymphozyten bestimmt. Ein Lymphozyt galt als vital, wenn er morphologisch intakt erschien und ein feingranuläres Fluoreszenzmuster zeigte (107). Homogen orange Anfärbung des Plasmas wurde als Zeichen des Zelltodes interpretiert (107). Eine Rosette wurde gezählt, wenn mindestens 4 Schafserythrozyten fest an einen Lymphozyten gebunden waren. Die Ansätze wurden blind ausgezählt, d.h. die Position der Kontroll und -Patientenseren auf der Mikrotiterplatte war nicht bekannt; ebensowenig die Diagnose der Patienten. Pro Serum wurden mindestens zwei Ansätze ausgezählt. Wenn die Rosettierung im Doppelansatz um mehr als 5% abwich, wurde auch der dritte Ansatz ausgezählt.

Die Intensität der Rosetteninhibition wurde wie folgt ausgedrückt:

$$\% \text{ Rosetteninhibition} = \frac{\%ER(Kontrolle) - \%ER(Test)}{\%ER(Test)}$$

Statistische Signifikanz wurde mittels des CHI^2-Tests anhand folgender Vierfeldertafel errechnet:

freie Ly Kontrolle	freie Lymphozyten Test
Rosetten Kontrolle	Rosetten Test

Danach ist Signifikanz auf dem p = 0.05 -Niveau erreicht, wenn $CHI^2 > 9.14$, wobei die Relation von 1 Kontrolle auf 9 Testseren berücksichtigt ist.

4.4 Bestimmung von SIF (Abb. 7)

Diese erfolgte nach der Methode von Brattig et al. (16). Es wurde der ^{3}H-TdR Einbau PHA-stimulierter Normallymphozyten nach Inkubation mit Kontroll- respektive Patientenserum verglichen.
10^5 PBMC einer gesunden Kontrollperson, suspendiert in 200 ul RPMI 1640 angereichert mit 20 % Patienten respektive -Kontrollserum und 10 ug PHA werden 48 h lang in flachbödigen Mikrotiterplatten bei 37 °C im Brutschrank bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre mit 5 % CO_2 inkubiert. Pro Platte werden als Kontrolle Seren von 3 verschiedenen Spendern verwendet. Wo Serumfraktionen getestet wurden, enthielten die Ansätze 15 % Normalserum zusätzlich

SCHEMA DER SIF-BESTIMMUNG

1.KULTUR	normale Lympozyten	+ Patienten resp. Kontrollserum + PHA
	42 h Inkubation bei 37 °C dann Zugabe von ^{3}H-Tdr weitere 6 h Inkubation	
2.WASCHEN UND ERNTEN	mehrfaches Auswaschen des radioaktiven Überstandes und Absaugen der Zellen auf Glasfaserfilter mit dem Mehrkanalzellsammler (SKATRON)	
3.BESTIMMUNG DER INKORPORIERTEN RADIOAKTIVITÄT	Die Glasfaserfilter mit den Zellen werden in Polypropylengefässen mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.	

Abb. 7: Schematische Darstellung der Technik des Lymphozytentransformationshemmtests (SIF-Test). Erläuterungen s. Text.

zu der zu testenden Fraktion, um Proteinmangeleinflüsse auszuschalten.
6 h vor Ende der Inkubation (nach 42 h) wurde jedem Ansatz 1 uCi/ml ^{3}H-TdR zugegeben. Am Ende der 48-stündigen Inkubation wurden die Zellen mit einem Mehrkanalzellkultursammler (Multi Channel Cell Harvester, Skatron) auf Glasfaserfilter abgesaugt, gewaschen und in Polyethylenfläschen getrocknet.
Die Messung der Radioaktivität der Filter erfolgte in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (43 ml Liquifluor^{R} auf 1 l Toluol) mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Isokap, Zinnser). Es wurden dreifache Bestimmungen durchgeführt, deren Standardabweichung bei 12 $\pm$ 6 % lag. Die transformationshemmende Aktivität (SIF-Aktivität) wurde ausgedrückt als:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \frac{\text{mittlere cpm(Kontr. - Test)}}{\text{cpm Kontrolle}}$$

Die Hemmung wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Differenz zwischen Kontrolle und Test mindestens 2 Standardabweichungen betrug (gepaarter T-Test, $p \leq 0.05$. Für praktische Zwecke kann ein Inhibitionsindex von 30 % als signifikant gelten.

5. Ergebnisse

5.1 Biochenische Charakterisierung

Seren von 3 Patienten mit starker RIF und SIF Aktivität wurden mittels isopyknischer Dichtegradienten-Ultrazentrifugation in 4 Fraktionen unterschiedlicher Dichte separiert (Abb.8, 22). RIF Aktivität wurde nur in den beiden leichtesten Fraktionen mit einer Dichte von $< 1.10\ g/cm^3$ gefunden. Die hier gefundene Inhibition war höher als die im nativen Serum.

SEPARATION VON RIF UND SIF AKTIVITÄT DURCH ISOPYKNISCHE ULTRAZENTRIFUGATION

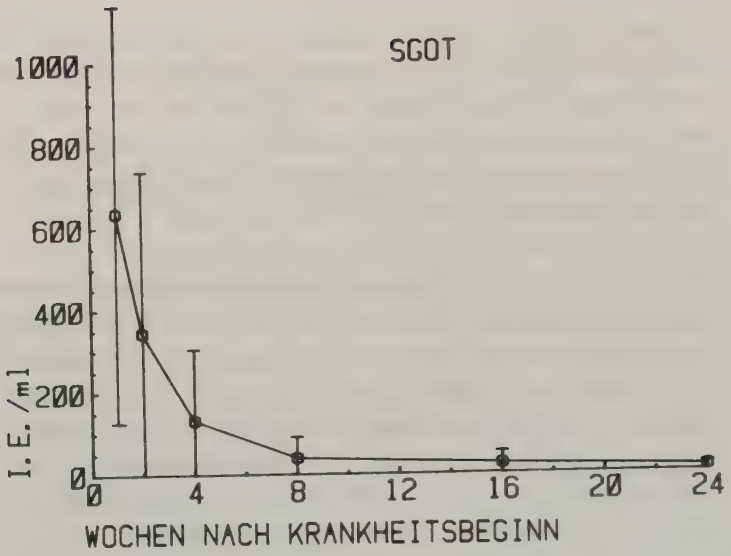
Fraktion Nr.	Dichte g/cm	RIF Index %	SIF Index %	Elektrophorese
1 (oben)	< 1.1	35	0	Beta Lipoprot.
2	ca.1.1	33	0	Beta Lipoprot.
3		0	14	Alpha Lipoprot.
4 (unten)	> 1.15	0	63	Masse der Serumproteine

Abb 8: Separation von RIF und SIF Aktivität durch Dichtegradientenultrazentrifugation. Erläuterungen s. Text.

SIF Aktivität fand sich dagegen nur in der untersten, dichtesten Fraktion (Dichte > 1.15 g/cm^3). Die Masse der Serumproteine, HBsAg und die Immunglobuline der 3 Hauptklassen wurden ebenfalls nur in dieser Fraktion nachgewiesen. Auch hier zeigte sich, daß die am stärksten hemmende Fraktion eine stärkere Inhibition bewirkt als das native Serum.
Die 2 leichteren, RIF positiven Fraktionen wanderten in der Lipidelektrophorese mit Betamobilität. Immunelektrophoretisch zeigte sich eine Präzipitationslinie gegen Anti-Betalipoprotein, jedoch nicht gegen Seren mit Anti-Immunglobulinspezifität oder Anti-Albumin. RIF und SIF -Aktivität werden somit durch biochemisch verschiedene Stoffe hervorgerufen. RIF scheint zu den Betalipoproteinen zu gehören.

5.2 RIF und SIF bei akuter Virushepatitis (AVH)

122 Seren von 30 Patienten mit akuter Virushepatitis (24 Hepatitis B, 3 Non A Non B, 3 Hepatitis A) wurden über einen Zeitraum von 4 bis 24 Wochen untersucht. Die Abb. 9 - 11 zeigen den Verlauf der klinisch-chemischen Bestimmungen sowie von HBsAg und der immunsuppressiven Faktoren.



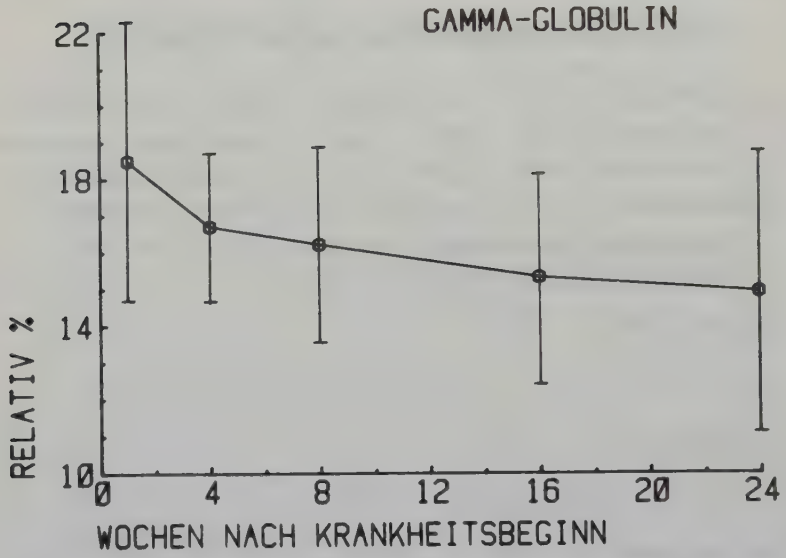


Abb. 9: Serum Glutamat-Oxalazetattransaminase (oben) und Gamma-Globuline (unten) im Verlauf bei 30 Patienten mit AVH.

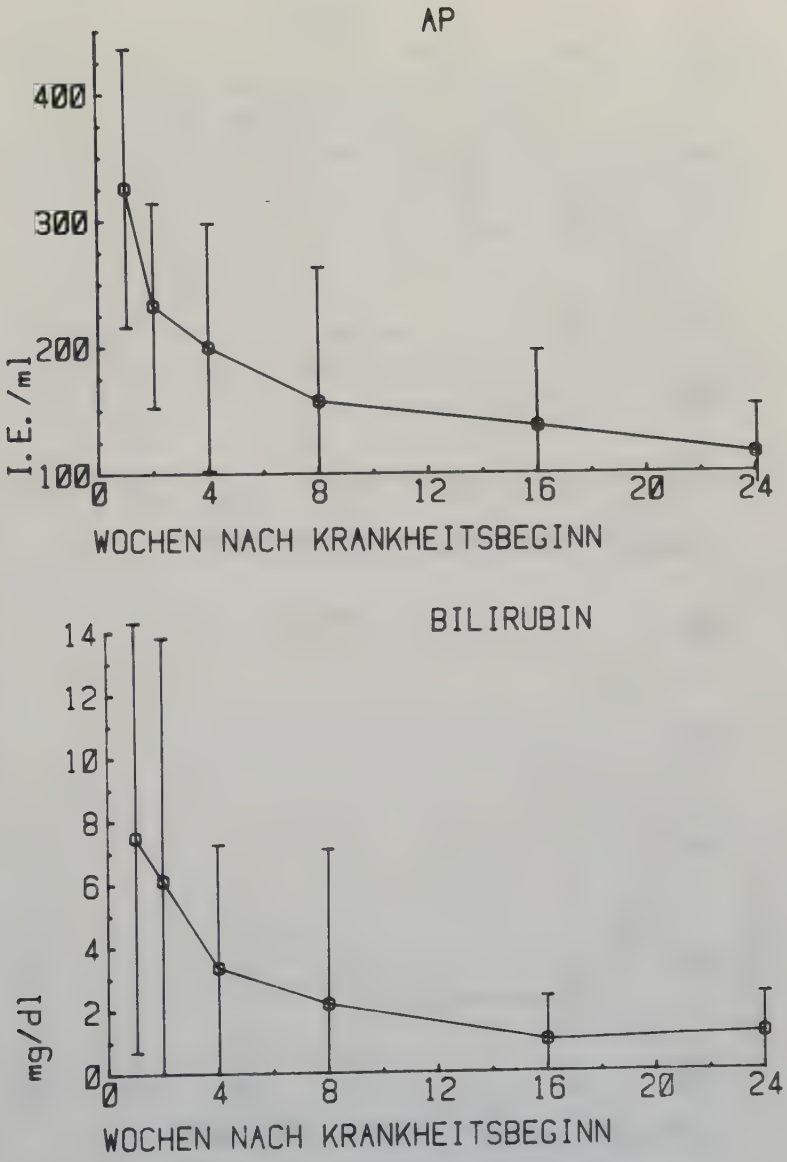


Abb. 10: Alkalische Phosphatase (oben) und Bilirubin im Verlauf bei 26 Patienten mit AVH.

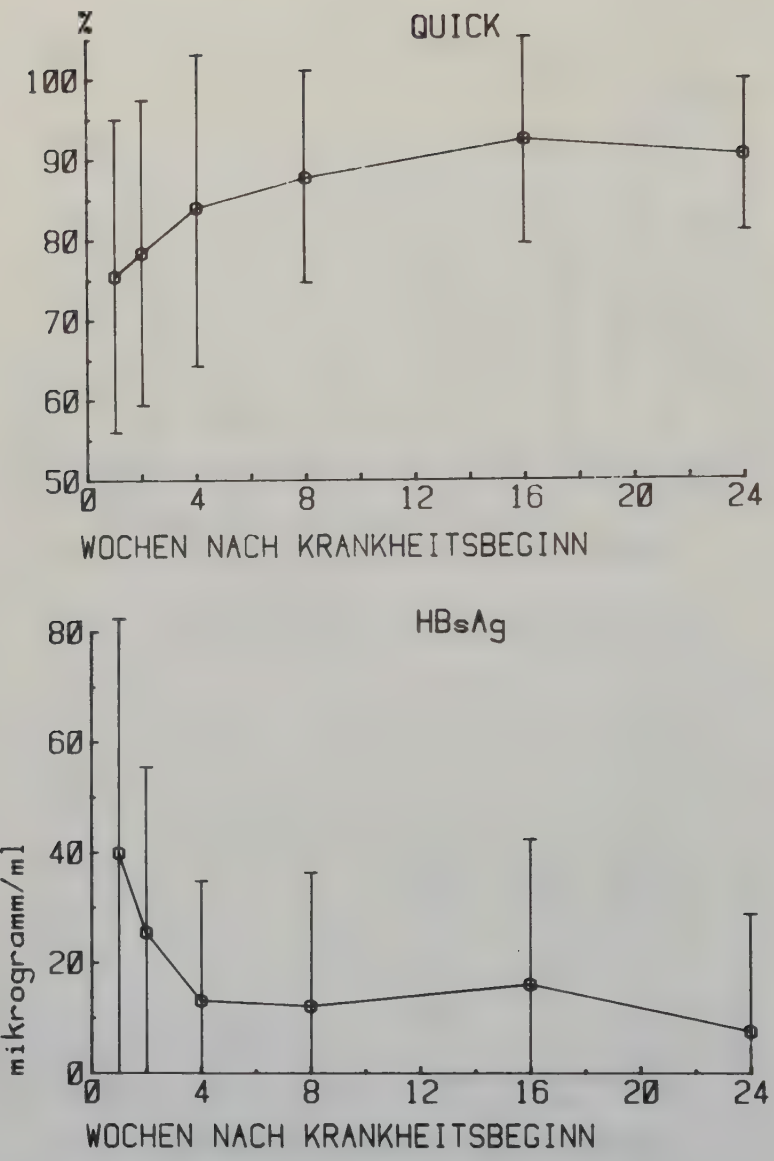


Abb. 11: Quick (oben) und quantitativ bestimmtes HBsAg im Verlauf bei 26 Patienten (HBsAg) mit AVH.

Abb. 12 zeigt die Verteilung der gemessenen Aktivitäten der immunsuppressiven Faktoren in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer. Während der ersten 2 Wochen nach Krankheitsbeginn werden signifikannte Aktivitäten von RIF bei 62% der Patienten gemessen (Abb. 12a), von SIF bei 87 % (Abb. 12b). Nach 8 Wochen waren nur noch 4 Patienten RIF positiv (15 %) und 6 Patienten SIF positiv (20 %). Am Ende der Beobachtungszeit waren bei 26 Patienten (82 %) beide immunsuppressive Faktoren nicht mehr nachzuweisen. Je 4 Patienten zeigten noch RIF bzw. SIF -Aktivität.

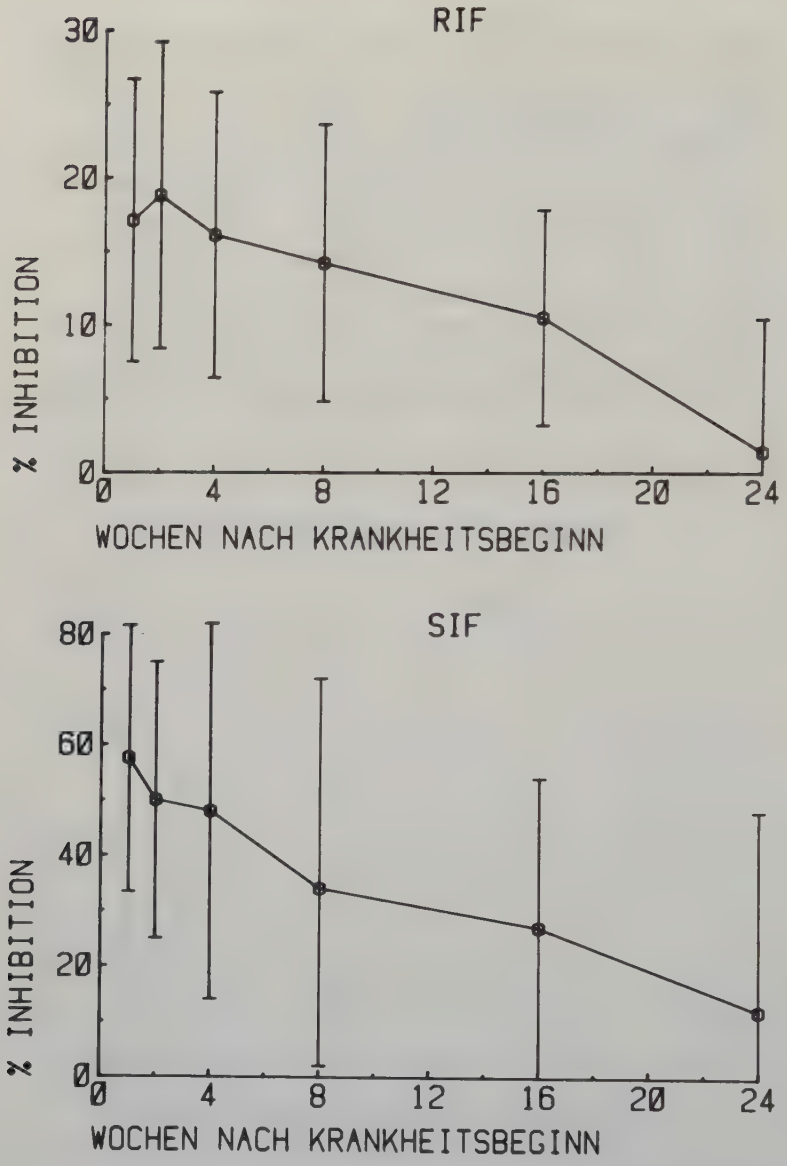


Abb. 12: Rosetteninhibitionsfaktor und Seruminhibitionsfaktor im Verlauf bei 30 Patienten mit AVH. Erläuterung s. Text.

Bei 27 Patienten spiegelte das Verhalten beider Faktoren den klinischen und biochemischen Verlauf der Krankheit wieder: 25 dieser Patienten erholten sich klinisch vollständig innerhalb des Beobachtungszeitraums. Alle klinisch-chemischen Parameter normalisierten sich und (bei Hepatitis B) wurde HBsAg regulär eliminiert. RIF und SIF waren in dieser Gruppe nur vorübergehend nachzuweisen. Abb. 13 zeigt den Verlauf der immunsuppressiven Faktoren zusammen mit SGPT und HBsAg in einem solchen unkomplizierten Verlauf.

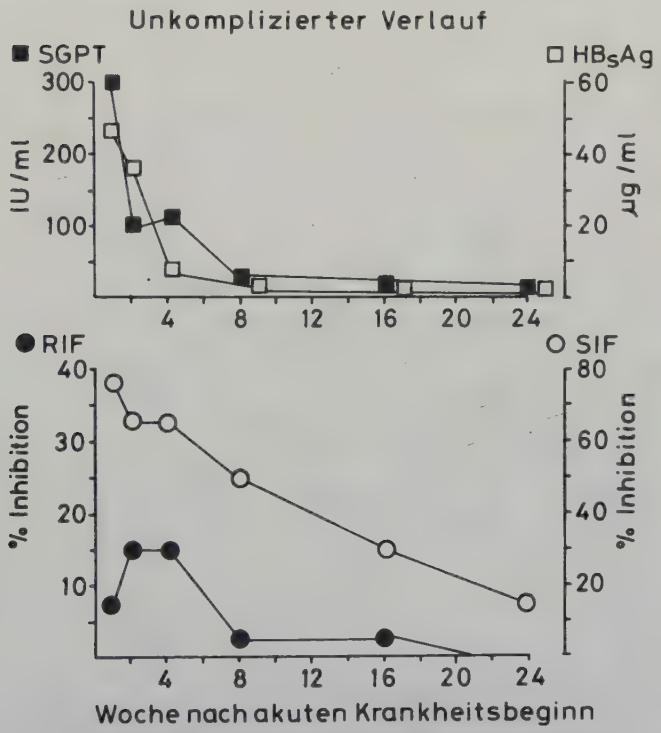


Abb. 13: RIF und SIF (oben) sowie HBsAg und SGOT in einem unkomplizierten Verlauf einer akuten Hepatitis B. Erläuterungen s. Text.

Bei 3 Patienten entwickelte sich ein protrahierter oder chronischer Verlauf. Die Transaminasen normalisierten sich nicht vollständig, die HBsAg-Konzentration im Serum blieb hoch und zeigte keine fallende Tendenz.
Bei 2 von diesen 3 Patienten blieben RIF und SIF bis zum Ende des Beobachtungszeitraums nachweisbar. Ein solcher komplizierter Verlauf ist in Abb. 14 dargestellt. Beim dritten Patienten waren dagegen RIF nach 12 und SIF nach 10 Wochen nicht mehr nachweisbar ("falsch negativ").

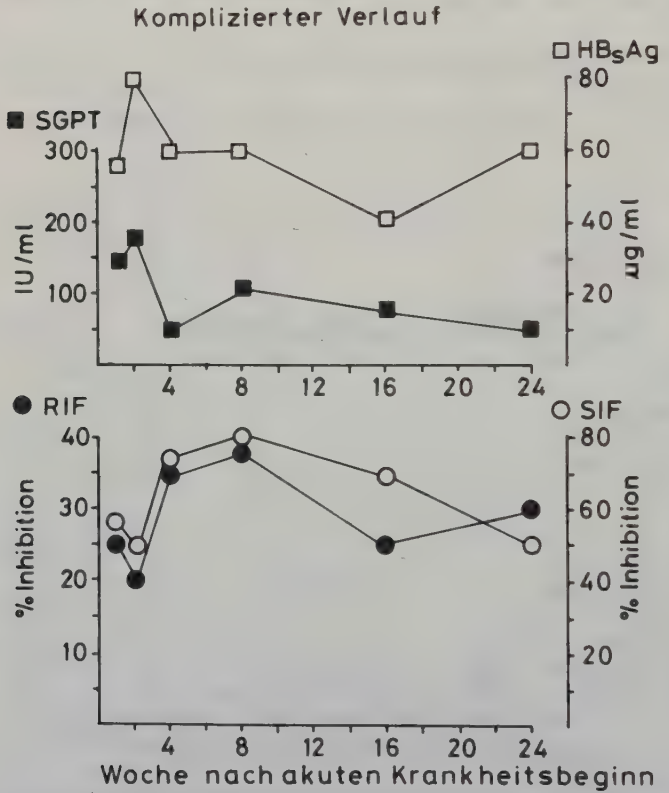


Abb. 14: Die Immunsuppressiven Faktoren in einem komplizierten Fall der akuten Virushepatitis B. Erläuterungen s. Text.

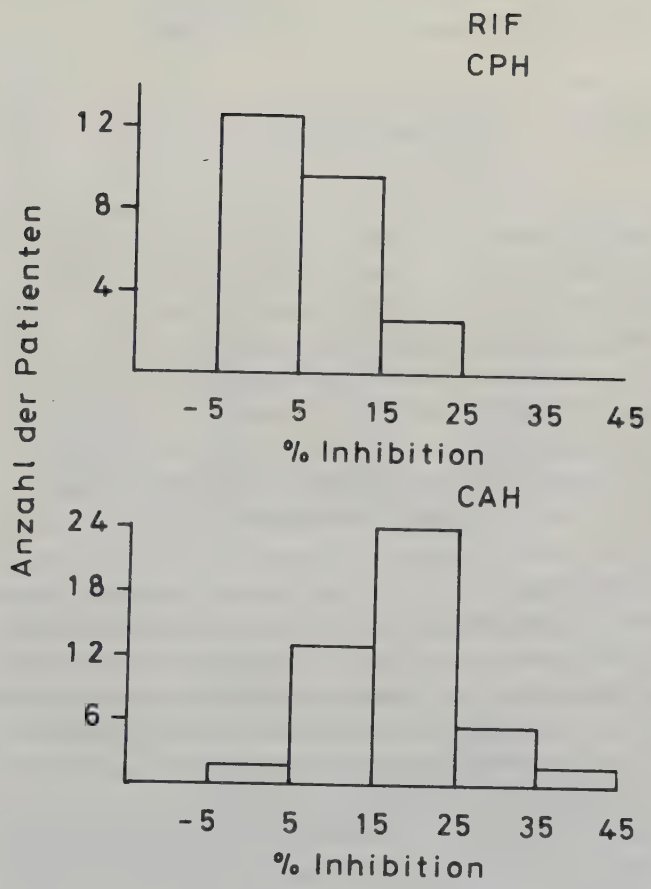


Abb. 15: Verteilung der RIF-Aktivität bei CAH und CPH. Das CAH-Histogramm erscheint gegenüber dem CPH-Histogramm als Ausdruck der grösseren RIF-Aktivität linksverschoben.

Bei einem Patienten bleiben beide immunsuppressive Faktoren nachweisbar, obwohl die Krankheit klinisch und biochemisch komplikationslos ausgeheilt war und HBsAg eliminiert wurde ("falsch positiv").

5.3 RIF bei chronischer Hepatitis

Signifikante RIF Aktivität wurde in 69 % aller Seren von 101 Patienten mit der histologischen Diagnose "chronisch aggressive Hepatitis" gefunden. Dies entspricht dem Wert in den ersten Wochen der akuten Virushepatitis, jedoch ist die durchschnittliche Aktivität mit 20 % etwas geringer als bei AVH (24 %). Die Verteilung der Aktivität zeigt Abb. 15:
RIF erscheint unabhängig von virologischen Parametern (Abb. 16) und wird etwa gleich häufig gefunden in der Gruppe der HBsAg positiven wie der für alle Marker von Virus B negativen Seren. Lediglich die HBsAg positiven aber HBeAg negativen Seren zeigen eine niedrigere Aktivität. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Rangkorrelationstest nach Wilcoxon). Wie die Ergebnisse der biochemischen Separation der Faktoren vermuten liessen, wird RIF mit etwa gleicher Häufigkeit in der SIF positiven wie in der SIF negativen Gruppe gesehen.

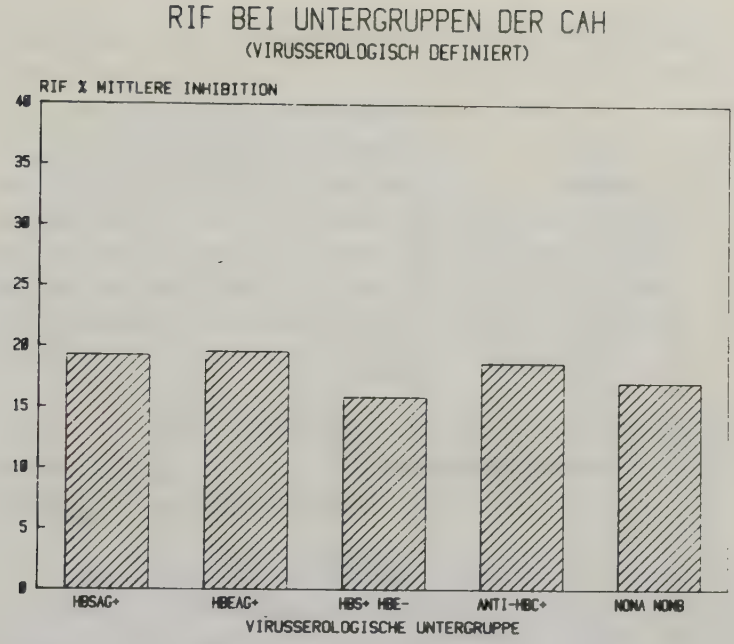


Abb. 16: RIF in verschiedenen serologisch definierten Gruppen der CAH sowie in Abhängigkeit von SIF. RIF erscheint unabhängig von serologischen Markern der Virus B Infektion und ist gleich häufig in der SIF positiven wie -negativen Gruppe.

Bei Patienten mit histologisch als chronisch persistiernd eingestufter Hepatis wurde SIF in der Regel nicht oder nur in niedriger Aktivität nachgewiesen. Die Verteilung der Aktivität zeigt Abb. 15b . Nur 3 von 26 Patienten (11.5 %) zeigten RIF niedriger Aktivität. Der Unterschied zur CAH ist statistisch signifikant. ($p < 0.001$, Wilcoxon-Test).

5.4 SIF bei chronischer Hepatitis

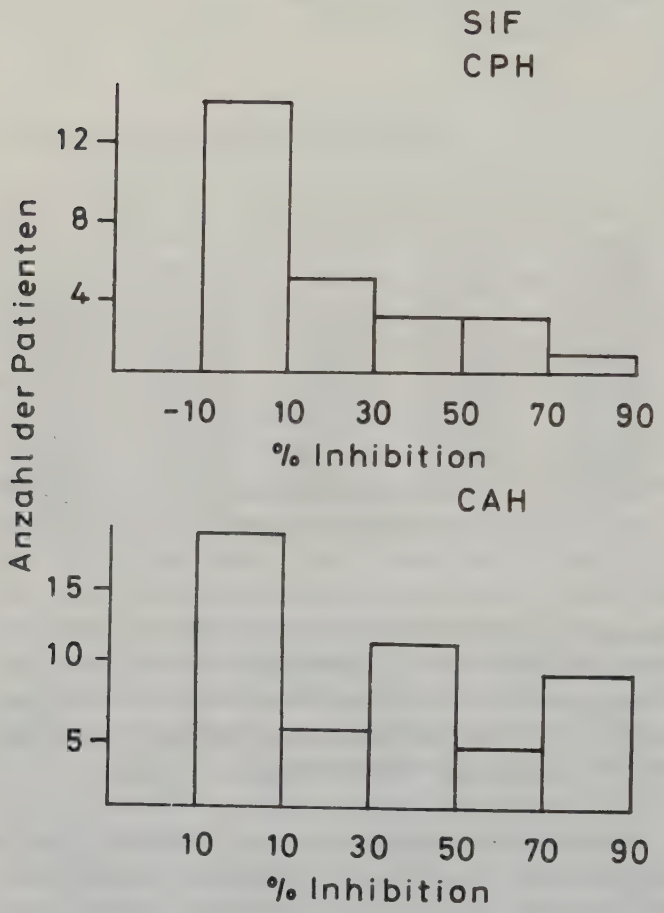


Abb. 17: Die Verteilung der gefundenen SIF-Aktivität bei CAH und CPH.

Signifikante SIF Aktivität wurde bei 34 von 78 Patienten mit histologisch als aggressiv eingestufter chronischer Hepatitis gefunden (43.6 %).
Abb. 17 zeigt die Verteilung der SIF Aktivität.
Das CAH-Histogramm ist im Vergleich zu dem der ersten Wochen der AVH nach links verschoben, die mittlere SIF Aktivität ist also deutlich geringer. Im Gegensatz zu den Befunden bei RIF sind Die Histogramme von CAH und CPH kaum gegeneinander verschoben, es besteht keine signifikante Aktivitätsdifferenz.

Abb.18 zeigt den durchschnittlichen SIF-Index in verschiedenen durch die virologischen Parameter definierten Untergruppen der CAH.

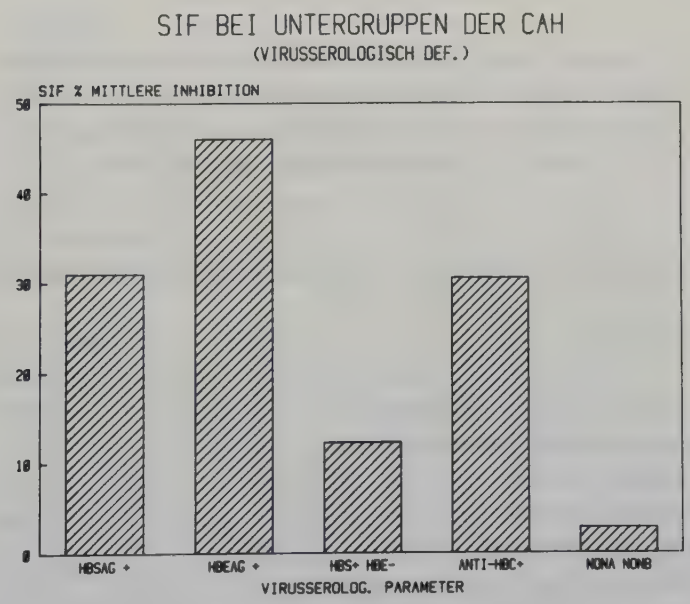


Abb. 18: SIF bei virusserologisch definierten Untergruppen der CAH (N = 101). Erläuterungen s. Text.

Im Gegensatz zu RIF zeigen sich hier deutliche Unterschiede: Der höchste durchschnittliche Inhibitionsindex wird mit 45 % bei der HBeAg positiven, der niedrigste mit 2.8 % in der Gruppe der B-Marker negativen CAH gefunden (p 0.05). Die SIF Aktivität war signifikant höher bei den HBeAg positiven als bei den HBsAg positiven, HBeAg negativen (p SIF zeigt also eine Assoziation zu serologischen Markern der Virus B Infektion.Die gefundene mittlere SIF Aktivität bei histologisch als persistierend eingestufter chronischer Hepatitis lag mit 15.3 % etwas niedriger als bei der CAH.

5.4 RIF und SIF bei anderen Krankheiten

SIF konnte auch bei Leberkrankheiten nicht viraler Genese sowie bei Viruskrankheiten, die nicht oder nicht primär die Leber betreffen, in 27 bis 60 % der getesten Fälle nachgewiesen werden (Tab. 1).

Tabelle 1: Häufigkeit von SIF bei anderen Krankheiten

Diagnose	N Pat.	SIF+	%
Primär biliäre Zirrhose	17	9	53
Alkoholische Leberzirrhose	22	9	27
Drogen Hepatitis	8	4	50
Infektiöes Mononukleose [1]	5	3	60
Virusmyokarditis	13	7	54
Systemischer Lupus erythem.	9	5	56

[1] Epstein Barr Virus, keine Transaminasenerhöhung

RIF wurde dagegen nur bei Leberkrankheiten beobachtet. Eine Spezifität für die (akute und chronische) Virushepatitis wurde nicht beobachtet; signifikante Aktivitäten von RIF fanden sich auch bei 9 von 17 Patienten mit PBC sowie bei 6 von 22 Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose (Tab. 2). Während bei der alkoholischen Lebercirrhose die durchschnittliche Inhibition deutlich geringer war als bei CAH, war die Aktivität bei PBC fast gleich hoch.

Tabelle 2: Häufigkeit von RIF bei anderen Krankheiten

Diagnose	N Pat.	RIF+	% pos.
Primär biliäre Zirrhose	17	7	41
Alkoholische Leberzirrhose	22	6	22
Drogen induzierte Hepatitis	5	1	20
Infektiöse Mononukleose	4	0	0
Virusmyokarditis	4	0	0
Systemischer Lupus erythem.	6	0	0

DISKUSSION

1.Akute Virushepatitis

RIF wurde bei 62 % der Patienten mit akuten Virushepatitis innerhalb der ersten 14 Tage nach Diagnosestellung gefunden. Dieser Wert liegt etwas über den von Chisari et al. beschriebenen von 42 % (23) bzw. 53 % (25). Die grössere Empfindlichkeit geht vermutlich auf die von uns verwendete Modifikation der Methode zurück. Mit der ursprünglich beschriebenen Methode (22) fanden wir RIF nur in 21% der Seren von Hepatitispatienten. Entscheidend für die grössere Sensitivität dürften die kürzeren Inkubationszeiten im Rosettentest (21, 22, 73) sowie das Arbeiten auf Eis bei den Waschvorgängen gewesen sein. Die modifizierte Methode ist der kürzeren Halbwertszeit von RIF (22, s.auch Ergebnisteil S. 17) angepasst.

Die RIF (wie auch SIF) -Aktivität nahm im Verlauf der Krankheit ab (sofern dieser unkompliziert war) und war in der Regel nach 8 Wochen nicht mehr signifikant erhöht (in Übereinstimmung mit Chisari et al., 23, 25).
Bei den hier untersuchten Fällen handelt es sich überwiegend um Hepatitis B (24 von 30 Patienten). Die Zahl der untersuchten nicht-B-Hepatitiden war zu klein, um signifikante Unterschiede demonstrieren zu können. In einer Pilotuntersuchung mit Seren von 2o Patienten mit akuter Hepatitis A fanden wir RIF mit ähnlicher Häufigkeit und Intensität. Die 3 in der verlaufsmässigen Untersuchung erfassten Hepatitis A-Patienten zeigten alle RIF mindestens einmal innerhalb der ersten 14 Tage, ebenso 2 der

3 Patienten mit Hepatitis NONA NONB. Routenberg et al. (105) fanden RIF in vergleichbarer Häufigkeit bei 130 Patienten mit akuter Hepatitis A. Chisari et al. beschreiben RIF in der akuten Phase auch bei Hepatitis NONA NONB (25).Bei den von uns untersuchten chronischen Hepatitiden zeigte RIF keine Assoziation zu serologischen Markern von Virus B. RIF scheint somit keine Assoziation zu einem bestimmten Hepatitisvirus zu haben, wofür auch die Befunde bei den chronischen Hepatitiden sprechen.

Bei drei der von uns untersuchten Patienten nahm die Krankheit einen protrahierten oder chronischen Verlauf: HBsAg zeigte keine abfallende Tendenz von Anfang an (ein sensibles, frühes Kriterium, 53), und die Transaminasen normalisierten sich nicht. Bei zweien dieser Patienten persistierten beide Faktoren, beim dritten verschwanden sie ungewöhnlich spät (nach 1o (SIF) bzw 12 (RIF) Wochen). Nur bei einem Patienten mit klinischer Ausheilung wurde RIF am Ende des Beobachtungszeitraums noch nachgewiesen. Chisari et al. (25) fanden RIF bei allen 10 untersuchten Patientn mit "unresolved hepatitis", jedoch nicht bei 27 Patienten mit "resolved hepatitis". Routenberg et al. (105) fand eine Beziehung zwischen der Persistenz von RIF und einer protrahierten Verlaufsform der AVH A. Beide Gruppen beschreiben, daß nur der "extrinsische" Rosettierungsdefekt (durch RIF-Wirkung erzeugte) prognostische Bedeutung habe; nicht aber der intrinsische (verminderte ER-Bildung der Patientenlymphozyten, nicht reversibel bei Kultur in Normalserum). Letzterer hielt wesentlich länger an und war unspezifischer. Es besteht somit gute Evidenz, daß die Persistenz von RIF bei AVH (länger als 4 bis 8 Wochen) für einen protrahierten oder chronischen Verlauf spricht.

Die Existenz von Serumfaktoren bei Virushepatitis, die die mitogeniduzierte Transformation normaler Lymphozyten hemmen, wurde u.a. von Newble (95), Nakao (91), Tremolada (131) sowie Brattig (115), Brattig und Berg beschrieben (16). Die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Persistenz dieser immunsuppressiven Serumaktivität und einem protrahierten oder chronischen Verlauf der Hepatitis. Brattig charakterisierte den Faktor (SIF) als ein mit Albumin oder Alphaglobulin assoziiertes Molekül das wahrscheinlich ein niedriges Molekulargewicht hat. Es wirkt als Antiaktivator hemmend auf verschiedene T-Zell Funktionen. Sie zeigten, daß es sich bei RIF und SIF nicht um identische Stoffe handelt. SIF tritt nicht spezifisch bei Virushepatitis auf, sondern wurde bei einer Reihe weiterer Infektionskrankheiten, Autoimmunerkrankungen und Tumorkrankheiten beschrieben (91 - 93).

Wir fanden signifikante SIF-Aktivität bei 87 % der Patienten mit akuter Virushepatitis mindestens einmal innerhalb der ersten 14 Tage nach Transaminasenanstieg. Die Werte fielen bei unkompliziertem Verlauf rasch ab und normalisierten sich in der Regel nach 4 - 8 Wochen, parallel zum Abfall von RIF und zur Normalisierung der klinischen, biochemischn und virologischen Parameter. Eine gewisse Korrelation mit der RIF-Aktivität ($r = 0.5$) wurde zwar gefunden; diese spiegelt aber mit grosser Wahrscheinlichkeit nur den zeitlichen Verlauf der Ausheilung der Krankheit wieder, da sich ähnliche Korrelationen auch zu einigen biochemischen Parametern fanden. (Abb. 9-12).
Bei der akuten Virushepatitis (im Gegensatz zur chronischen) scheint die Persistenz SIF, wie RIF

ein früher Indikator eines komplizierten Verlaufes zu sein. Unter 30 verlaufsmässig untersuchten Patienten fand sich ein in beiden Faktoren "falsch negativer" sowie bei RIF und SIF je ein"falsch positiver" (einer der Faktoren am Ende des Beobachtungszeitraums noch nicht normalisiert). Es wurde kein Fall klinischer und serologischer Normalisierung beobachtet, bei dem beide immunsuppressiven Faktoren persistierten. Die gleichzeitige Bestimmung von RIF und SIF dürfte die Spezifität der prognostischen Aussage erhöhen.

RIF bei chronischen Hepatitiden

In dieser Untersuchung wurde RIF bei 69 % der 1o1 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis (CAH) gefunden, dagegen nur bei 11 % der 26 untersuchten Fälle mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH). Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen virus-serologischen Subgruppen; lediglich die Aktivität in der HBeAg positiven Gruppe war (nicht signifikant) höher. Diese Ergebnisse sind in vernünftiger Übereinstimmung mit Chisari et al. (25), der RIF bei 7 von 8 Patienten (87.5 %) mit HBsAg positiver CAH fand, jedoch nicht bei 10 Patienten mit CPH. Perillo et al. (99) beschrieben RIF hoher Aktivität bei 10 Patienten mit HBsAg positiver CAH (37^{+}-9 %) durchschnittliche Inhibition), während bei CPH B die durchschnittliche Inhibition nur 29 $\pm$ 12 % betrug. Die Autoren fanden, daß RIF die Krankheitsaktivität mit höherer Spezifität und geringerer Sensitivität wiedergibt als die Bestimmung von Serumcholylglycin (98). Sie empfahlen die kombinierte Bestimmung beider Parameter zur Verlaufsbeurteilung chronischer Hepatitiden. Sie beschreiben auch signifikant höhere RIF-Aktivität bei HBeAg positiven CAH als in HBsAg positiven HBeAg

negativen Fällen, was in der Tendenz unseren Befunden entspricht. Bei chronischen HBsAg-Trägern ohne Zeichen einer Hepatitis wurde RIF sehr niedriger Aktivität gefunden. Diese Befunde dürften weniger eine Assoziation von RIF mit dem Virus B als eine Korrelation mit dem Schweregrad der Leberschädigung wiedergeben, da HBeAg positive Hepatitiden wohl schwerer verlaufen als solche, die nur HBsAg aber nicht HBeAg aufweisen (23, 25, 88). Dolen et al. (48) beobachteten bei einer 23-jährigen Patientin mit CAH B nach Behandlung mit Fibroblasteninterferon das Verschwinden von RIF sowie die Elimination von HBeAg und DNA-Polymerase sowie eine Zunahme der zirkulierenden T-Lymphozyten.
Salerno et al. (110) beschreiben ER-Inhibition bei 81 % der untersuchten CAH-Patienten, jedoch nicht bei Patienten mit CPH. Sie verwendeten den Standard-Rosetteninhibitionstest zur Bestimmung der T-Zellaktivierung, keinen RIF-Test. Die Inhibition ging bei 4 von 9 Patienten durch immunsupperssive Therapie zurück.
Es besteht also weitgehende Übereinstimmung, daß RIF-Aktivität bei chronischer Hepatitis mit höherer entzündlicher Aktivität korreliert und bei aktiver Hepatitis verschiedener Ätiologie in der Regel gefunden wird, bei persistierender hingegen nicht.

SIF bei chronischen Hepatitiden; Spezifität

In dieser Untersuchung war SIF bei der chronisch aktiven Hepatitis mit 43 % weniger häufig als RIF (69 %). Im Gegensatz zu RIF zeigte SIF keine Korrelation mit der histologischen Aktivität und wurde in ähnlicher Häufigkeit bei der chronisch persistiernden Hepatitis gefunden. Interessanterweise

zeigt sich aber eine Assoziation zu Markern der HBV-Infektion: Die durchschnittliche SIF aktivität war bei den HBsAg positiven Hepatitiden signifikant höher als bei den für alle HBV-Marker negativen ($p \leq 0.05$ im Wilcoxon Rangkorrelationstest). Die höchste Aktivität wurde in der Gruppe der HBeAg postiven CAH gefunden. Möglicherweise hängt die Entstehung von SIF weniger mit dem Grad der Leberzellschädigung zusammen und mehr mit fortlaufender immunologischer Auseinandersetzung mit einem Antigen (16, s. u.).
SIF ist nach unseren Untersuchungen nicht spezifisch für Hepatitis, noch für Leberkrankheiten im weiteren Sinne. Wir fanden SIF mit ähnlicher Häufigkeit und Intensität bei alkoholischer Leberzirrhose, infektiöser Mononukleose und Virusmyocarditis sowie bei systemischen Lupus erythemathodes (44,45). In der Literatur werden SIF-artige Aktivitäten bei einer Reihe von akut und chronisch entzündlichen Krankheiten, Autoimmunerkrankungen und Tumorkrankheiten beschrieben. Eine Literaturübersicht findet sich bei Brattig (15).

Spezifität von RIF

Die Verminderung E-rosettierender Lymphozyten im peripheren Blut ist ein weitverbreitetes Phänomen. Ausser bei akuter und chronischer Virushepatitis (23, 25, 48, 98, 99, 108, 110, 112) und anderen Leberkrankheiten, z.B. extrahepatische Cholostase (125), medikamentenallergischer Hepatitis (46) wurden verminderte Proportionen zirkulierender E-rosettierender Lymphozyten (meist gleich gesetzt mit T-Lymphozyten) bei einer Reihe weiterer Krankheiten gefunden, u.a. Tumoren, Nierenkrankungen, Tuberkulose, Schwangerschaft u.a. sowie durch eine Reihe von

Drogen bewirkt (s.unten). Nicht immer wurde zwischen dem intrinsischen Rosettierungsdefekt (= die Patientenzellen rosettieren vermindert, die Supression ist nicht reversibel bei Kultur in Normalserum und nicht durch Serum auf normale Spenderzellen übertragbar) und dem extrinsischen Defekt unterschieden (Hemmung der E Rosettierung normaler Spenderzellen, hervorgerufen durch Inkubation in Patientenserum), welcher beim RIF-Effekt vorliegt.
So finden sich bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL, lymphozytisches Lymphom) und anderen B-Zell Lymphomen und -Leukämien die E-rosettierenden Zellen absolut und relativ vermindert. Der Effekt ist wohl intrinsisch und beruht auf der Verdrängung von T-Zellen durch Tumorzellen mit Nicht B Natur. Bei Morbus Hodgekin fanden Di Perri et al. (47) und Swain et al. (128) einen verminderten Anteil ER+ Zellen im peripheren Blut. Bei einem Teil der Patienten konnte die Rosettierung durch Levamisol (ein die T-Zelldifferenzierung förderndes Thymushormon) verbessert werden. Auch hier handelt es sich eher um den intrinsischen Defekt. Bieber et al. (12) beschreiben eine komplexe, Betalipoprotein enthaltende Substanz aus Milzextrakt von Patienten mit Morbus Hodgekin, die die E-Rosettierung auch normaler Spenderlymphozyten reversibel hemmt. Entsprechende Extrakte aus Milzen anderer Spender zeigten diesen Effekt nicht.
Yambe et al. (143) beschrieben verminderte E-Rosettierung bei dem T-Zellymphom Mycosis fungoides. Die Hemmung wurde durch 2o-stündige Kultur in Normalserum aufgehoben und Serum von Mycosis fungoides Patienten mit supprimierter Rosettierung wirkte inhibierend auf Spenderlymphozyten, so daß auf einen Serumfaktor geschlossen werden muß. Serum von MF-Patienten mit normalen Zahlen zirkulierender ER+

Zellen hemmten nicht. Ursächlich vermuten die Autoren einen Anti T-Zell-Antikörper, wie sie bei Mycosis fungoides beschrieben sind. Mit Sicherheit handelte es sich nicht um ein Lipoprotein (wie RIF).
Anthony et al. (7) beschrieben verminderte T- und vermehrte Nullzellen bei Patienten mit Bronchialcarcinom, besonders Plattenepithelcarcinom. Die Wirkung von Patientenserum auf normale Lymphozyten wurde nicht geprüft, jedoch lässt die gleichzeitige Vermehrung der Nullzellen an Serumfaktoren denken. Die Autoren fanden weiterhin, daß die Zellen von Patienten mit geringerer Rosettierung eine kürzere Überlebenszeit hatten.
Whitehead et al. (136, 137) fanden ER-hemmende Aktivität im Serum von Patientinnen mit Mammacarcinom. Die Häufigkeit des Befundes korrelierte mit der Ausdehnung des Tumors; alle Seren von Patientinnen im Stadium IV zeigten die Aktivität. Die Inhibition konnte durch Waschen der Zellen aufgehoben werden und war nicht durch ein Betalipoprotein hervorgerufen. Die Autoren fanden, in Übereinstimmung mit unserer Erfahrung, daß die Technik des Rosettenassays einen grossen Einfluß auf den gemessenen Inhibitionsindex hat und daß zur Bestimmung seruminduzierter ER-Hemmung eine relativ kurze Kälteinkubationszeit (hier eineinhalb Stunden) günstig ist.
Akaza et al. (3a) und Yokohama et al. (144) beschreiben eine ER-Inhibition bei Patienten mit Blasencarcinom, die sich durch den Aminopeptidaseninhibitor Bestatin in Vivo und in Vitro aufheben ließ; in Vitro auch durch Levamisol. Die Autoren vermuten eine seruminduzierte Inhibition; Patientenseren hemmten normale Kontrollymphozyten allerdings nicht.
Hann et al. (66) fanden einen ER-inhibierenden Serumfaktor bei 12 von 17 Kindern mit Neuroblastom Stadium IV (mit Knochenmetastasen), jedoch nur bei 1 von

13 im Stadium IVS (ohne Knochenmetastasen). Sie schlossen, daß der Nachweis des ER-hemmenden Faktors von prognostischer Bedeutung ist.
Petri et al. (101) fanden stark verminderte E-Rosettierung, zum Teil seruminduziert, bei Patienten mit Carcinomen des oberen Gstrointestinaltraktes. Sie beschreiben auch einen verminderte mitogeninduzierte Lymphozytentransformation.
Shukla et al. (118) beschrieben einen ER-hemmenden Serumfaktor ebenfalls bei Carcinomen des oberen Gastrointestinaltraktes. Die Aktivität korrelierte mit der Tumormasse und verschwand bei den operablen Patienten innerhalb von 3 Monaten nach Tumorentfernung. Bei den nicht operierten Patienten wurde eine zunehmende Leukopenie mit überproportionalem Abfall der rosettierenden Lymphozyten beobachtet.
Eastham et al. (52) zeigten eine Verminderung E-rosettierender Zellen bei Patienten mit Plattenepithelcarcinom von Kopf und Hals. Ein Einfluß von Serumfaktoren wurde nicht untersucht. Methotrexat und Isoniazid hatten keinen Einfluß, BCG schien die Rosettierung zu verbessern. Bei einem Patienten verschwand die ER-Hemmung nach operativer Tumorentfernung. Die Autoren glauben, daß der ER-Test zur Verlaufskontrolle geeignet ist.
Deegan et al. (42) fanden eine Beziehung zwischen dem Grad der ER-Suppression und dem klinischen Stadium sowie dem histologischen Entdifferenzierungsgrad bei derselben Krankheit. Sie wiesen einen Serumfaktor nach, der kein Immunkomplex war.
Carmignani et al. (18) fanden verminderte E-Rosettierung im Nierenvenenblut von Patienten mit Nierencarcinom, verglichen mit dem Nierenarterienblut oder dem venösen Blut aus der kontralateralen, gesunden Niere. Sie führten dies auf einen durch den Tumor produzierten T-Zell hemmenden Faktor zurück.

Denkbar wäre aber auch eine selektive Filtration der T-Zellen durch den Tumor.
Sawanobri et al. (112) fanden ER inhibierende Aktivität im Serum von Patientinnen mit Carcinoma in situ der Cervix uteri, nicht jedoch bei Patientinnen mit schwerer Dysplasie. Sie halten den Rosetteninhibitionstest für geeignet zum Erkennen von Risikopatienten.
Shore et al. (115) fanden bei Patienten mit Myasthenia gravis einen ER-inhibierenden Serumfaktor mit IgG-Charakteristik, dessen Aktivität durch D-Tubocurarin blockiert werden konnte. Dieser Antikörper wurde (im Gegensatz zu dem mit Spezifität für die motorischen Endplatten) durch Thymektomie nicht beeinflußt.
Sergott et al. (114) sowie Balasc et al. (10) fanden eine verminderte Zahl ER+ Lymphozyten bei Patienten mit infiltrativer Ophtalmopathie, nicht aber bei solchen mit Thyreotoxikose ohne Ophtalmopathie. Die Hemmung war nicht seruminduziert.
Glinski et al. (62, 63) beschreiben verminderte E-Rosettierung und Mitogenstimulierbarkeit bei Patienten mit Psoriasis vulgaris. Die Zahl der Nullzellen war erhöht und die Hemmung war reversibel bei Kultur in Normalserum. Die Aktivität des rosetteninhibierenden Serumfaktors stieg innerhalb der ersten zwei Monate nach Beginn der Hautmanifestationen an, korrelierte mit der klinischen Aktivität und verschwand bei Remission. Sie korrelierte weiter mit der Reduktion der DNCB-Sensibilität.
Wieczorek et al. (136) beschrieben RIF (charakterisiert als beta-Lipoprotein) im Serum von Patienten mit aktiver Lungentuberkulose. Sie fanden einen weiter Serumfaktor (Rosette restoring factor, RRF), der die RIF-Wirkung aufhebt (119 - 121). Die Wirkung beider Faktoren wurde durch Hemmer der Prostaglandin-

synthese reduziert (121).
Price et al. (104) beschreiben eine ausgeprägte ER-hemmende Aktivität im Serum von Patienten mit Sarkoidose. Die Autoren sehen einen Zusammenhang mit der verminderten zellulären Immunantwort bei dieser Krankheit.
Amadori et al. (4) fanden eine 30 - 40 prozentige Hemmung der ER normaler Lymphozyten durch Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Sie beobachteten auch eine Hemmung der PHA induzierten Lymphozytentransformation (SIF-Effekt). Die Kinetik der Serumwirkung läßt, wie auch bei den Sarkoidosebefunden, weniger an eine RIF-artige Wirkung denken, da letztere eine wesentlich längere Inkubationszeit erfordert (22).
Morton et al. (89) fanden im Serum von Frühschwangeren einen ER-inhibierenden Faktor. Clarke et al. (30) beschrieben einen solchen Faktor mit hohem Molekulargewicht bei schwangeren Mäusen ab der sechsten Stunde nach Fertilisation. Die Autoren vermuteten eine Schutzfunktion für den jungen Embryo. Lymphozyten von Neugeborenen zeigen einen verminderten Anteil ER+-Zellen (39). Sie sind jedoch normal mitogenstimulierbar. Ob der Befund auf Serumfaktoren zurückgeht, wurde nicht eindeutig demonstriert.
Pozilli et al. (103) fanden eine ER hemmende Aktivität bei 66 % von 64 neuentdeckten juvenilen Diabetikern. Die Aktivität war nicht in der LDL-Fraktion enthalten. Es fand sich keine Korrelation zu Inselzell-Antikörpern, lymphozytotoxischen Antikörpern und Blutzuckerspiegeln. Die Autoren diskutieren einen Zusammenhang mit der verminderten Infektresistenz von Diabetikern sowie mit einer möglichen viralen Ätiologie des Diabetes bei den betroffenen Patienten. Shohat et al. (116) beschrieben rosettenhemmende Serumfaktoren bei Patienten mit Morbus

Cushing . Der Faktor gehörte nicht der Lipoproteinfraktion an.
Maisch et al. (85) fanden ER-hemmende und transformationshemmende Aktivität in Seren von Patienten mit Postperikardiotomiesyndrom. SIF wurde bei allen, RIF nur bei Teil der Patienten gefunden. Die Autoren vermuteten eine prognostische Verwertbarkeit von RIF und zeigten, daß bei beiden Faktoren biochemisch verschieden waren. Die Höhe der berichteten Rosetteninhibition (zwischen 50 und 100 %) läßt vermuten, daß andere Faktoren als RIF zur Inhibition beitrugen, da sich durch RIF eine Hemmung von maximal 50 % erzielen läßt (21, 22). Weiterhin ist eine pharmakologisch bedingte ER-Hemmung denkbar, z. B. durch Theophyllin oder Beta-Sympathicomimetika (21).
Kro et al. (79) beschrieben ER-hemmende Aktivität sowie zirkulierende Immunkomplexe in den Seren der meisten Patienten mit Morbus Crohn. Die Rosetteninhibition konnte zum Teil durch Levamisol aufgehoben werden. Die Autoren sahen eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität.
Surrenti et al. (127) fanden ebenfalls ER-hemmende sowie transformationshemmende Serumaktivität bei Patienten mit Morbus Crohn. Sie vermuteten einen Zusammenhang mit der verminderten zellulären Immunantwort bei dieser Krankheit, stellten aber keine Korrelation mit der klinischen Aktivität und Dauer fest. Darmresektion hatte ebenfalls keinen Einfluß. Malabsorptiosbedingte Defekte werden als ätiologische Faktoren diskutiert.
Abiko et al. (1, 2) beschrieben ER-hemmende Serumfaktoren bei Patienten mit nephrotischem Syndrom. Die Hemmung liess sich zum Teil durch Thymosin alpha 1 aufheben.
Tomizawa et al. (130) fand eine plasmainduzierte Hemmung der Lymphozytentransformation und ER in

Patienten mit Minimal Change Nephrotic Syndrom. Beide Hemmungen korrelierten mit der Krankheitsaktivität. Die Reaktion der Patientenzellen besserte sich durch Plasmapherese.
Raptopoulou-Gigi et al. (105) fanden rosetteninhibierende Serumfaktoren bei urämischen Patienten. Der Rosettierungsdefekt der Patientenlymphozyten war reversibel bei Kultur in Normalserum oder fötalem Kälberserum.
Bei Marihuanarauchern wurden ebenfalls verminderte Zahlen ER+ Zellen berichtet (37). Ob es sich um einen serumvermittelten Defekt handelt, ist nicht bekannt.
Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die E-Rosettierung hemmende Serumaktivitäten nicht selten und sicher weder für Leberkrankheiten im allgemeinen, noch für Virushepatitiden im besonderen spezifisch sind. Wenn der zeitliche Ablauf der Hemmung in Betracht gezogen wird als Kriterium, lassen sich einige andere Mechanismen als Ursache schon erkennen. Möglicherweise sind nur in ganz wenigen Fällen Lipoproteine für die Hemmung verantwortlich. Dies kann jedoch im einfachen RIF-Assay wie von Chisari beschrieben (22) sowie in der von uns angewandten Modifikation nicht erkannt werden. Außerdem sind bei mindestens zwei weiteren Krankheiten LDL-Inhibitoren der E-Rosettierung beschrieben (1, 2, 138, 139). Das von Chisari et al. beschriebene abnorme LDL mit ungewöhnlicher Apolipoproteinkomposition und sehr niedriger Dichte (22, 23) mag spezifisch für Virushepatitiden sein wie von den Autoren gefordert. Um ganz sicher zu gehen, daß der Rosettierungsdefekt nicht durch eine andere Substanz erzeugt wird, müsste man bei den hemmende Seren eine biochemische Charakterisierung durchführen, die sehr aufwendig ist (22, 67) und für die klinische Routine kaum

in Frage kommt. Dennoch scheint eine ER-hemmende Serumaktivität in der überwiegenden Zahl der Fälle durch eine Leberkrankheit bedingt zu sein und in dieser Gruppe am häufigsten durch Virushepatitiden. Außerdem erscheint die Verfolgung von RIF mit dem Rosettentest zur Verlaufskontrolle auch ohne den Nachweis der Lipoproteinnatur des Hemmfaktors sinnvoll.

Einfluß von Drogen auf die E-Rosettierung in vitro

Inkubation der Lymphozyten und zum Teil auch der SRBC mit einer Reihe von Drogen verändert die Rosettierungsfähigkeit teilweise erheblich. Mehrere Wirkungsmechanismen können grundsätzlich unterschieden werden: Änderung der Membranstruktur der Zelle durch direkte physikalische oder chemische Einwirkung, Blockade von Rezeptoren, Beeinflussung von Stoffwechselvorgängen (z. B. der Membransynthese). Letztere werden häufig durch zyklische Nukleotide vermittelt. So hemmt cAMP die E-Rosettierung (9, 21, 58, 75), cGMP verbessert sie (65). Entsprechend ist für eine Reihe von Medikamente, die den intracellulären cAMP-Spiegel erhöhen, eine ER-Inhibition nachgewiesen; so für Isoproterenol (21, 55, 58, 65), Salbutamol (58), Theophyllin (21, 58, 65), Choleratoxin (21). Propranolol vermindert die Isoproterenol induzierte ER-Hemmung (50, 65). Interessanterweise zeigen Lymphozyten von Patienten mit chronischem Asthma bronchiale eine wesentliche geringere Inhibition der E-Rosettierung durch Isoproterenol als Normalpersonen, nicht aber durch cAMP oder Theophyllin (81). Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der Theorie von der Betarezeptorendysfunktion bei Asthmapatienten. Unerklärt ist, warum Thymusextrakte (Thymopoetin oder -Fragmente), die ebenfalls den cAMP Spiegel erhöhen, auch rosettierungsfördernd

wirken (1, 2). Auch manche Prostaglandine sowie Samenflüssigkeit und Marihuana wirken ER-hemmend (27, 51, 64, 87), ebenso Histamin (5, 11, 86), wohl ebenfalls über den cAMP-Mechanismus. Mesenchymales Antigen (20) und aggregiertes IgG (41) hemmen gleichfalls die E-Rosettierung. Die Prostaglandin induzierte Hemmung wurde durch Indometacin (gleichzeitige Inkubation) aufgehoben (64). Die Histamin induzierte Hemmung liess sich durch Cimetidin aufheben (86). Andere Autoren (133) fanden keine signifikante Inhibition bei vergleichbarer Konzentration von Histamin. Das alpha-Sympathicomimetikum Phenylephrin sowie das Cholinergicum Carbamylcholin erhöhen die Rosettierung (65). Der Effekt liess sich durch Phentolamin respektive Atropin blockieren und war reversibel. Levamisol hebt die durch Serum von Patienten mit nephrotischem Syndrom (1, 2) induzierte ER-Hemmung auf, ebenso die durch Theophyllin und Adenosin in vitro erzeugte (80). Eine analoge Wirkung zeigten Thymosinfragmente (80). Der Aminopeptidaseninhibitor Bestatin hob die durch Serum von Patienten mit Blasencarcinom induzierte ER-Inhibition auf (144). Eine Beschleunigung der Regeneration der ER-Funktion trypsinbehandelter Lymphozyten konnte durch ein Leukoytendialysat ("Transferfaktor") erzielt werden (133). Thymus und -Gehirndialysate hatten ähnliche Wirkung, nicht aber entsprechende Präparationen aus Leberzellen und Fibroblasten. Die Autoren vermuten eine beschleunigte Synthese von Rezeptoren der Zellmembran und stellen einen Zusammenhang mit der verbesserten immunologischen Kompetenz mancher immundefizienter Patienten nach Injektion des Leukozytendialysates her.

Die Wirkung von RIF erscheint der Wirkung dieser Gruppe analog. Der zeitliche Anstieg der Inhibition, die Höhe der maximalen Inhibition (etwa 50 %), die

Reversibilität und die Kinetik der Erholung der Zellen von der RIF-Wirkung bei Kultur in Normalserum (22) lassen einen ähnlichen Mechanismus vermuten. Chisari et al. (22) zeigten, daß die RIF-Wirkung vom Zellmetabolismus abhängt, vermutlich durch cAMP vermittelt ist und über eine verminderte Synthese von Membranrezeptoren der Lymphozyten für SRBC führt. Die Synthese dieser Rezeptoren (Glycoproteide, 24, 76) ist ein aktiver, energieverbrauchender Prozess, der durch metabolische Inhibitoren gehemmt werden kann. Analog dazu verhält sich die Erholung der Lymphozyten von der RIF-induzierten ER-Hemmung (22).

Direkte Einwirkung auf die Zellmembran

Trypsin hemmt die ER-Funktion massiv, sowohl wenn die Lymphozyten als auch wenn die Schafserythrozyten damit inkubiert werden (8, 56). Interessanterweise verhindert Bestatin, ein Aminopeptidaseninhibitor, die durch Serum von Blasencarcinompatienten erzeugte ER-Hemmung (144). Die Trypsinwirkung wird über Abspaltung oder Veränderung von Rezeptorstrukturen erklärt. Neuraminidase verstärkt dagegen die E - Rosettierung bzw. führt zu stabileren Rosetten, die weniger leicht gehemmt werden können 8, 32, 56, 60). Die meisten Autoren vermuten, daß die Abspaltung des negativ geladenen Neuraminsäurerestes zu einer Verminderung der negativen Ladung der Zellen und somit zu einer Verminderung der elektrostatischen Abstoßung führt, was den intensiveren Membrankontakt ermöglicht. Entsprechend wirkt Neuraminsäure bei Inkubation sowohl der Lymphozyten als auch der SRBC. Die ER-stabilisierende Wirkung von AET (Diäthylaminoethoniumbromid, einem SH-Reagenz) wird über die Aufspaltung von S-S Bindungen erklärt,

die Rezeptoren besser zugänglich machen soll (69). Auch Dextran führt zu einer stabileren Rosettierung (69). Calcium und Magnesium -Ionen fördern die Stabilität (6, 21, 90). Ca^{2+} soll als Ionen Brücke wirken (21). Ca- freie Kulturmedien und EDTA stören die Rosettierung erheblich, ebenso bestimmte Eisensalze (43, 97) und manche Monosaccharide (78), sowie SRBC-Fragmente (96), Lidocain (109), und halogenierte Kohlenwasserstoffe (113). AET, Neuraminidase und Dextran (17) werden zur Stabilisierung der E-Rosettierung verwendet, wenn diese zur Bestimmung der T-Zellzahl oder zu Zellseparationszwecken benutzt wird. Wenn es um die Erfassung von Rosetteninhibition geht, fanden wir rosettenstabilisierende Techniken ungeeignet, da sie subtilere Hemmungen verdecken.

Antilymphozytenserum (ALS, anti T-Serum) führt zu einer starken Reduktion der ER in vitro und in vivo (40, 57, 72). Neben der Verminderung der T-Zellen durch das ALS spielt möglicherweise die Blockierung von Rezeptoren eine Rolle. Der ER-Assay wird zur Bestimmung der Wirksamkeit von ALS-Präparationen eingesetzt (56, 72).
Für Vinblastin und Cholchizin, Substanzen die den mikrotubulären Apparat der Zellen hemmen, konnten signifikante ER-Hemmungen nicht nachgewiesen werden (31, 142). Cytochalasin B, das den mikrofilamentären Apparat hemmt, wirkt dagegen inhibitorisch, ebenso Cordacin (105).
Im Zusammenhang mit der Verwendung eines Rosettenassays bei Leberkrankheiten interessant ist die Hemmung durch Gallensäuren (126) und oxygenierte Sterole (124). Wir fanden im Gegensatz zu Surrenti et al. (125) keine Korrelation zwischen ER-Hemmung und Serumkonzentrationen von Bilirubin und alkalischer Phosphatase. Therapeutisch verwendete Dosen

von Theophyllin und Isoproterenol zeigten ebenfalls keinen Einfluß. Die Endkonzentration der Drogen, wenn sie über das Testserum in den Assay gelangen, ist ein bis zwei Grössenordnungen unter der in den in vitro Tests verwandten, so daß eine Störung des RIF Assays von dieser Seite kaum zu befürchten ist.

Biologische Rolle und mögliche Herkunft der Faktoren

Es wird heute überwiegend akzeptiert, daß die Leberzellschädigung bei akuter und chronischer Hepatitis nicht eine zytotoxische Wirkung der Hepatitisviren, sondern Folge einer Interaktion zwischen Viren oder virusinfizierten Zellen mit dem Immunsystem des Trägers ist (11a, 49a, 51b). Die Immunpathogenese der akuten und chronischen Hepatitis (B) ist hingegen noch weitgehend unklar. Es gibt Hinweise, daß zelluläre Mechanismen eine grössere Rolle spielen als humorale (49a). Verschiedene Hypothesen wurden entwickelt: Zytolyse durch gegen infizierte Hepatozyten sensibilisierte spezifische Effektor-T-Zellen (CMC) (Dudley et al., 49a); und Zytolyse durch antikörperabhängige K-Zellen (ADCC) (Eddleston, Williams et al., 51a), wobei die Antikörper gegen leberspezifisches Protein (LSP, 88a) oder in der Membran exprimierte virale Antigene gerichtet sein könnte. Chisari und Edgington (27a) haben ein allgemeineres Modell vorgeschlagen in dem immunregulative Moleküle eine wichtige Rolle spielen: Nach Infektion des Hepatozyten mit dem Virus und dessen Integration im Genom der Zelle sowie nach Expression viraler Antigene in der Zellmembran (ein möglicherweise durch Antikörper modulierter Prozess) findet eine Umstellung des Zellmetabolismus statt, die auch normalerweise

vorhandene immunregulativ wirkende Moleküle betrifft (z. B. Very Light Density Lipoproteins - VLDL-, 33 - 36, 54). Zusätzlich sollen dabei neue (pathologische) immunregulative Moleküle entstehen, z. B. RIF. Diese Moleküle können die Antikörperantwort und die Suppressorzellaktivität hemmen und dadurch die Basis für eine verstärkte zytotoxische Effektorzellaktivität gegen virale und Leberantigene schaffen. Dise führt zur Leberzellschädigung, wodurch eine zweite Sorte immunregulativer Moleküle freigesetzt wird, z. B. LEx (27), SIF (11a). Diese hemmen lokal die zytolytische Aktivität in verschiedenem Ausmaß, abhängig von ihrer Konzentration in den Target-Zellen, die starken individuellen Schwankungen unterliegt (Target cell factor, 27). Vom Grad dieser feed back Hemmung könnte dann der Ausgang der Infektion - Heilung, fulminanter Verlauf, chronische Hepatitis, chronischer assymptomatischer Carrier Status - abhängen. Für die Hypothese spricht der Befund einer - allerdings unspezifisch - gesteigerten spontanen T-Zell vermittelten Zytolyse (SCMC, 46a) bei chronischer Hepatitis B, aber auch im chronischen Carrier Status. RIF fällt dabei die Rolle der ersten Sorte immunregulativer Moleküle zu, die durch den infektionsbedingt umgestellten Zellmetabolismus entstehen und systemisch wirken. Hohe RIF-Aktivität wäre dann ungünstig, da sie zu vermehrter zytotoxischer Aktivität führt. LEx (15, 27) könnte in diesem Modell die protektive Funktion des bei Leberzellschädigung freigesetzten lokalen, die Zytolyse begrenzenden Faktors zugeordnet werden. SIF könnte dem LEx vergleichbar sein, kann aber auch schon zu einem früheren Zeitpunkt im Verlauf einer Virushepatitis (in der Inkubationszeit) auftreten (Berg und Brattig, 11a). Im letzteren Fall muss für SIF eine andere Quelle angenommen werden z. B. Zellen des Immunsystems.

Ob es sich bei SIF um den postulierten lokalen Feedbackfaktor handelt oder um einen Antiaktivator anderer Herkunft, kann mit dem Transformationshemmtest nicht differenziert werden. Der Nachweis von SIF wäre in beiden Fällen nicht als primär ungünstig zu werten, jedoch als Zeichen andauernder immunologischer Auseinandersetzung.
Chisari et al. fanden RIF nur bei Virushepatitis (A, B, NonA NonB) und halten ihn für ein virushepatitisspezifisches, möglicherweise viruskodiertes Lipoprotein. Wir fanden RIF-analoge Aktivität auch bei nichtviralen Leberkrankheiten wie primär biliärer Zirrhose und alkoholischer Leberzirrhose. Andere Autoren beschreiben eine vergleichbare Aktivität, die durch Stoffe der LDL-Fraktion hervorgerufen wird bei aktiver Lungentuberkulose und nephrotischem Syndrom (s. o.), beides Krankheiten die fettstoffwechselaktive Organe betreffen.

Es ist seit langem bekannt, daß bei einer Reihe akuter und chronischer Leberkrankheiten - nicht nur bei Virushepatitis - abnorme Lipoproteinmuster auftreten (90, 112a). Diese werden durch wegen unspezifisch gestörter Lebersynthese verminderte Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase (LCAT)- Aktivität, verminderte Aktivität hepatischer Lipase und Synthese abnormer Apolipoproteine erklärt (112a). Dabei tritt eine starke Vermehrung der Intermediate Density Liproproteins (IDL) auf, die ebenfalls immunsuppressive Eigenschaften haben (33 - 36). Ein abnormes, von dem mit Cholostase assoziierten LPx verschiedenes Lipoprotein wurde von Müller et al. charakterisiert: Beta 2-LP (112a). Dieses Lipoprotein hat in seinen physikochemischen Eigenschaften sowie seinem Auftreten bei Leberkrankheiten bemerkenswerte Ähnlichkeit mit RIF wie von Chisari et al. charakterisiert (22). Es wäre also möglich, daß es sich bei dem

von Chisari beschriebenen Molekül nicht um ein virushepatitisspezifisches handelt. Eine Korrelation der rosetteninhibierenden Aktivität mit dem histologischen Schweregrad, wie von uns und anderen gefunden (s. o.) könnte auch damit erklärt werden, daß der das pathologische Lipoprotein erzeugende Defekt der Lebersyntheseleistung mit dem Schweregrad der Erkrankung steigt. Eine zusätzliche (ungünstige) immunregulative Wirkung ist dennoch denkbar. Im Zusammenhang mit prognostischen Aussagen bei chronischen Leberkrankheiten erscheinen weitere Untersuchungen sinnvoll, die die Ersetzung des technisch anspruchsvollen RIF-Assays durch einfachere lipidchemische Methoden, z. B. Messung der LCAT-Aktivität betreffen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Abiko T, Onodera I, Sekino H. The effekt of a synthetic thymosin alpha 1 fragment on the inhibition of E-rosette formation by the serum of a patient with nephrotic syndrome. Chem Pharm Bull (Tokyo) 27:3171-5 (1979)

2. Abiko T, Onodera I, Sekino H. Synthesis and immunological effects of thymosin alpha 1 and its fragments on inhibitory factor in minimal change nephrotic syndrome. Chem Pharm Bull (Tokyo) 28: 3542-8 (1980)

3. Aiuti F, Cerottini JC, Coombs RA, Cooper HB, Dickler JS, Fudenberg HH, Greaves MF, Grey HM, Kunkel HG, Natvig G, Preudhomme JL, Rabellino E, Ritts RE, Rowe DS, Seligmann M, Siegel FP, Stjernswärd J, Terry WD, Wybran J. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Scand J Immunol 3:521-32 (1974)

3a. Akaza H, Yokoyama H, Umeda T, Najima T. Restoration by Levamisole of ER-formation and its abrogation by autochtonous serum from patients with bladder cancer. Cancer 43:97-100 (1979)

4. Amadori G, Semenzato G, Tosato F, Gasparotto G. Über den möglichen Einfluß plasmatischer Faktoren auf die lymphozytäre Stimulierbarkeit und E-Rosettenbildung bei primär chronischer Polyarthritis. Klin Wschr 56:671-6 (1978)

5. Ambanelli U, Ferraccioli GF, Mangenelli P, Vanona GL. Suppressor effects of histamine on SK/SD delayed hypersensitivity reactions in man and on E-rosette forming cells. Agents Actions 9:474-8 (1979)

6. Anderson R, Oosthuizen R, Gatner EM. Effects of ascorbate on leucocytes: Part V. Effects of ascorbate and calcium and sodium ascorbate on certain functions of human blood lymphocytes in vitro. S Afr Med J 56:511-5 (1979)

7. Anthony HM, Kirk JA, Madsen KE, Mason MK, Templeman GH, E and EAC rosetting lymphocytes in patients with carcinoma of bronchus I. Some parameters of the test and its prognostic significance. Clin Exp Immunol 20:29-40 (1975)

8. Ashman RB, La Via MF, Sawanabori S, Nahmias AJ. Studies on the mechanism of E-rosette formation and inhibition. Clin Immunol Immunpathol 16:39-47 (1980)

9. Bach MA, Beaurain G. Cyclic AMP and T-cell differentiation. Ann Immunol (Paris) 127:967-73 (1976)

10. Balasc C, Leoevey A, Sztoika I, Szerze P, Szabo M, Bordan L, Fazakas S, Inhibition of spontaneous E rosetting by anti thymocyte globulin in Graves disease. Acta Med Acad Sci Hung 33:333-8 (1976).

11. Basinska MJ, Jodowska E. Effect of histamine on E and EAC rosettes formation of normal

and leukemic human lymphocytes. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 28: 895-9 (1980)

11a. Berg PA, Brattig N. Die Bedeutung immunregulativer Faktoren für ie prognostische Beurteilung der Virushepatitis. Med Klin 77: 419-24 (1982)

12. Bieber MM, Fuks Z, Kaplan HS. E-rosette inhibiting substance in Hodgekin´s disease spleen extracts. Clin Exp Immunol 29:369-75 (1977)

13. Birnbaum G. Numbers of rosette forming cells in human peripheral blood. Cell Immunol 21:371-8 (1976)

14. Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human peripheral blood. Scand J Clin Lab Invest 21 (suppl. 97):77-89 (1968)

15. Brattig N. Untersuchungen zur Bedeutung immunsuppressiver Serumfaktoren bei der akuten und chronischen Hepatitis. Dissertation Fachbereich Biologie, Tübingen 1978.

16. Brattig N, Berg PA. Immunosuppressive serum factors in viral hepatitis I. Characterization of serum inhibition factor as an antiactivator. Zur Veröffentlichung vorgelegt (1982)

17. Brown CS, Halpern H, Wortis HH. Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T cells in the presence of dextran. Clin Exp Immunol 20:505-12 (1978)

18. Carmignani G, Belgrano E, Puppo P, Cornaglia P. T Lymphocytes inhibiting factors in renal cancer: Evaluation of differences between arterial and venous blood levels of E rosette forming cells. J Urol 120:673-5 (1978)

19. Chen JY, Deng JS, Lin YC. Effects of cordacin on lymphocyte activity in vitro. Chin J Microbiol 10:112-4 (1977)

20. Chevrier A, Delpech B, Halavent C. Inhibition of the active E-rosette forming T lymphocytes by a mesenchyme associated antigen. Biomedecine (Express) 33:21-3 (1980)

21. Chisari FV, Edgington TS. Human T lymphocyte E rosette function I. A process modulated by intracellular cyclic AMP. J Exp Med 140:1122-6 (1974)

22. Chisari FV, Edgington TS. Lymphocyte E rosette inhibitory factor: A regulatory serum lipoprotein. J Exp Med 142:1092-1107 (1975)

23. Chisari VC, Routenberg JA, Edgington TS. Mechanisms responsible for defective human T lymphocyte sheep erythrocyte rosette function associated with hepatitis B virus infections. J Clin Invest 57: 1227-38 (1976)

24. Chisari FV. Immunoregulatory properties of human plasma in very low density lipoproteins. J Immunol 119:2129-2136 (1977)

25. Chisari FV, Routenberg JA, Fiala M, Edgington

TS. Extrinsic modulation of human T lymphocyte E rosette function associated with prolonged hepatocellular injuty after viral hepatitis. J Clin Invest 59: 134-142 (1977)

26. Chisari FV, Gealy WJ, Edgington TS. Recovery of soluble sheep erythrocyte receptor from the T lymphocyte surface by proteolytic cleavage. J Immunol 118:1138-42 (1977)

27. Chisari FV. Regulation of human lymphocyte function by a soluble extract from normal human liver. J Immunol 121:1279-86 (1978)

27a. Chisari FV, Routenberg JA, Anderson DS, Edgington TS. Cellular immune reactivity in hepatitis B virus-induced liver disease in viral hepatitis. In: Vyas GW, Cohen SW, Schmid R (eds) Viral hepatitis. Franklin Press. Philadelphia, PA. p 245

28. Chisari FV. Modulation of the in vivo immune response by human plasma very low density lipoproteins. Cell Immunol 52:223-8 (1980)

29. Chisholm RL, Tubergen DG. The significance of variing SRBC/T-cell ratio in T-cell rosette formation. J Immunol 116:1397-9 (1976)

30. Clarke FM, Morton H, Clunie GJ. Detection and separation of two serum factors responsible for depression of lymphocyte activity in pregnancy. Clin Exp Immunol 32:318-23 (1978)

31. Cohnen G, Fischer K, Brittinger G. Human T-lymphocyte rosette formation: Inhibition by

cytochalasin B. Immunology 29:337-41 (1975)

32. Cohnen G, Brittinger G. Studies on human T-lymphocyte rosette formation with human and sheep erythrocytes. Res Exp Med (Berlin) 166: 1-13 (1976)

33. Curtiss LK, Edgington TS. Regulatory serum lipoproteins: Regulation of lymphocyte stimulation by a species of low density lipoprotein. J Immunol 116:1452-8 (1976)

34. Curtiss LK, DeHeer DH, Edgintgon TS. In vivo suppression of the in vivo immune response by a species of low density serum lipoprotein. J Immunol 118: 648-52 (1977)

35. Curtiss LK, Edgington TS. Identification of lymphocyte surface receptor for low density lipoprotein inhibitor, an immunoregulatory species of normal human serum low density lipoprotein. J Clin Invest 1978:1298-1308 (1978)

36. Curtiss LK. Edgington TS. Differential sensitivity of lymphocyte subpopulationss to suppression by a low density lipoprotein inhibitor, an immunoregulatory human serum low density lipoprotein. J Clin Invest 63:193-201 (1979)

37. Cushman P, Grieco M, Gupta S. Reduction in T-lymphocytes forming active rosettes in chronic marijuana smokers. Int J Clin Pharmacol Biopharm 12:217-20 (1975)

38. D'Amelio R, Ciarla MV, Pandolfi F, Panichi G, Sposito M, Aiuti F. T and B lymphocytes in the liver and blood of subjects with acute and chronic hepatitis. Z Immun Forsch 155: 338-45 (1979)

39. Davis RH, Galant SP. Nonimmune rosette formation: A measure of the newborne infant's cellular immune response. J Pediatr 87:449-52 (1975)

40. Debray-Sachs M, Dardenne M, Bach JF. Evaluation of antibodies, antigens and immune camplexes present in anti lymphocyte serum. Postgrad Med J 52 (5. Suppl.):32-4 (1976)

41. De Cock W, De Cree J, Verhaegen H. Inhibition of the E-rosette formation of T-lymphocytes by aggregated human IgG and restoration by levamisole. Immunology 35:223-7 (1978)

42. Deegan MJ, Coulthard SW. Spontaneous rosette formation and rosette inhibition assays in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer 39:2137-41 (1977)

43. De Sousa M, Nishiya K. Inhibition of E-rosette formation by two iron salts. Cell Immunol 38: 203-8 (1978)

44. Del Giacco GS, Mathieu A, Loy M, Locci F, Cengiarotti L, Leone AL. E-rosette inhibition in systemic lupus erythematosus (letter). Arthritis Rheum 23:1406-7 (1980)

45. Del Giacco GS, Tognella S, Leone AL, Locci

F, Cornaglia P, Sangiuolo A, Grifoni V. Interference of levamisole with inhibition of E-rosette formation by Hodgekin's disease and systemic lupus erythematosus cytotoxic sera. Blood 53:1002-6 (1979)

46. Delpre G, Grinblat J, Kadish U, Livni E, Shohat B, Lewitus Z, Joshua H. Case report. Immunological studies in a case of hepatitis following methyldopa administration. Am J Med Sci 277:207-13 (1979)

46a. Dienstag JL, Bhan AK, Klingenstein J, Savarese AM. Immunopathogenesis of liver disease associated with Hepatitis B. In: Szmuness W, Alter HJ, Maynard JE (eds). Viral hepatitis. 1981 International Symposium. Franklin Press, Philadelphia, PA, S. 221

47. Di Perri T, Auteri A, Laghi Pasini F, Mattioli F, Volpi L. Action of levamisole on E-rosette forming cells and serum adenosine deaminase in Hodgekin´s disease. J Immunopharmacol 1:233-46 (1979)

48. Dolen JG, Carter WA, Horoszewicz JS, Vladutiu AO, Leibowitz AI, Nolan JP. Fibroblast interferon treatment of a patient with chronic active hepatitis. Increased number of circulating T lymphocytes and elimination of rosette inhibitory factor. Am J Med 67:127-31 (1979)

49. Doroszak N, Yoshida T, Cohen S. Subpopulations of lymphocytes to produce various lymphokines. I. Function of subpopulations separated by velocity sedimentation.

J Immunol 119:1617-20 (1977)

49a. Dudley FJ, Fox RA, Sherlock S. Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. Lancet 1 :723 (1972)

50. Dunne JV, Peters CJ, Moore TC, Vaughan JH. Differential effects of propranolol on lymphocyte rosette formation and response to plant mitogens. Arthritis Rheumatism 21:767-73 (1978)

51. Eastham RJ, Mason JM, Jennings BR, Belew PW, Maguda TA. T-cell rosette test in squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol 102:171-5 (1976)

51a. Eddlestone ALWF, Williams R. The role of immunological mechanisms in chronic hepatitis. Ann Clin Res 8:172-7 (1972)

51b. Edington TS, Chisari FV. Immunologic aspects of hepatitis B virus infection. Am J Med Sci 172:213-218 (1975)

52. Erten U, Emre T, Cacdar AO, Tuerker RK. An in vitro study on the effect of prostaglandin E2 and F2 alpha on E-rosette forming activity of normal lymphocytes. Prostaglandins Med 5:255-8 (1980)

53. Frösner GG, Schomerus H, Wiedmann KH, Zachoval R, Bayerl B, Bäcker U. Diagnostic significance of quantitative HBsAg determination in acute anc chronic hepatitis B infection. Zur Veröffentlichung angenommen (1981)

54. Fujii DK, Edgington TS. Direct suppression of lymphocyte induction by the immunoregulatory human serum low density lipoprotein, LDL-In. J Immunol 124:156-60 (1980)

55. Galant SP, Remo RA. Beta adrenergic inhibition of human T lymphocyte rosettes. J Immunol 114:512-13 (1980)

56. Galili U, Schlesinger M. The formation of stable E-rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or sheep red blood cells. J Immunol 112:1628-1634 (1974)

57. Galili U, Schlesinger M. Studies on the formation of E-rosettes by human T-lymphocytes and thymus cells. Effects of temperature, metabolic inhibitors and anti T sera. Isr J Med Sci 11:1357-67 (1975)

58. Gelfand EW, Dosch HM, Hastings B, Shore A. Lithium: A modulator of cyclic AMP-dependent events in lymphocytes? Science 203:365-7 (1979)

59. Geubel AP, Keller RH, Summerskill WHJ, Dickson ER, Tomasi TB, Shorter RG. Lymphocyte cytotoxicity and inhibition studied with autologous liver cells: Observations in chronic active liver disease and the primary biliary cirrhosis syndrome. Gastroenterology 71: 450-456 (1976)

60. Gilberstein RB, Metzgar RS. Human T and B lymphocyte rosette tests: Effect of enzymatic modification of sheep erythrothytes (E) and

the specificity of neuraminidase-treated E. Cell Immunol 24:97-108 (1976)

61. Giuliano AE, Rangel D, Golub SH, Holmes EC, Morton DL. Serum mediated immunosuppression in lung cancer. Cancer 43:917-24 (1979)

62. Glinski W, Haftek M, Obalek S, Jablonska S. Cell mediated immunity (CMI) in psoriasis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 26:755-60 (1978)

63. Glinski W, Obalek S, Langner A, Jablonska S, Haftek M. Defective function of T lymphocytes in psoriasis. J Invest Dermatol 70: 105-10 (1978)

64. Goodwin JS, Bromberg S, Staszak C, Kaszubowski PA, Messner RP, Neal JF. Effect of physical stress on sensitivity of lymphocytes to inhibition by prostaglandin E2. J Immunol 127: 518-22 (1981)

65. Grieco MH, Siegel I, Goelz Z. Modulation of human T-lymphocyte rosette formation by autonomic agonists and cyclic nucleotides. J Allerg Clin Immunol 58:149-59 (1976)

66. Hann HW, Evans AE, Cohen IJ, Leitmeyer JE. Biologic differences between neuroblastoma stages IV-S and IV. Measurements of serum ferritin and E-rosette inhibition in 30 children. N Engl J Med 305:425-9 (1981)

67. Hatch FT, Lees RS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv Lipid Res 6:1-68 (1968)

68. Hiramatsu K, Sakai H, Endoh M, Arimori S. Surface properties of LDL-binding lymphocytes in human peripheral blood. Immunology 39:311-6 (1980)

69. Hokland P, Hokland M, Heron I. An improved technique for obtaining E-rosettes with human lymphocytes and its use for B-cell purification. J Immunol Methods 13:175-82 (1976)

70. Horwitz DA, Garrett MA, Graig AH. Serum effects on mitogenic reactivity in subjects with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and skleroderma. Technical considerations and lack of correlation with anti-lymphocyte antibodies. Clin Exp Immunol 27:100-110 (1977)

71 Hsu CCS, Leevy CM. Inhibiton of PHA-stimulated lymhocyte transformation by plasma from patients with advanced alcoholic cirrhosis. Clin Exp Immunol 8:749 (1971)

72. Huang SW, Barber T, Poulik MD, Hong R. Morula forms of E-rosettes: Distribution, specific inhibition and enhancement. Pediatr Res 10:120-6 (1976)

73. Jondal M, Holm, Wigzell H. Surface markers of human T and B lymphocytes. I. A large proportion of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. J Exp Med 136:207-215 (1972)

74. Kalland T, A simple and rapid method to dis-

tinguish between rosettes and non specific aggregation of erythrocytes in the rosette assay for human T-lymphocytes. J Immunol Methods 17:279-83

75. Kalmar L, Gergely P, Petranyi G. Dissociation of the mitogenic and rosette forming effects of PHA to stimulators of cyclic AMP levels. Acta Med Acad Sci Hung 35:147-51 (1978)

76. Kamoun M, Martin J, Hansen JA, Brown MA, Siadak AW, Nowinski RC. Identification of a human T lymphocyte surface protein associated with the E-rosette receptor. J Exp Med 153:207-12 (1981)

77. Kaplan ME, Clark C. An improved rosetting assay for detection of human T lymphocytes. J immunol Methods 5:131-5 (1974)

78. Kopel S, Taub RN, Madyastha RK, Deutsch V, Baker MA. Monosaccharide inhibition of E-rosette formation. Clin Immunol Immunpathol 15:651-7 (1980)

79. Kro I, Kojecky Z, Matouskova I, Benysek L. Crohn´s disease, serum immunodepressive factors and circulating immune complexes. Boll Ist Sieroter Milan 59:619-24 (1980)

80. Laghi Pasini F, Auteri A, Ceccatelli L, Di Perri T. Pharmacologically induced depression of E-rosette forming cells (RFC) of normal healthy subjects. Restoration by levamisole and thymopoetin pentapeptide. Boll Soc Ital

Sper 56:316-22 (1980)

81. Lee CF, Han SH. Subnormal inhibition of active E rosette formation by isoproterenol in bronchial asthma. Chung Hua Min Kuo Wei Sheng Wu Chi Mien I Hsueh Tsa Chi 13:128-37 (1980)

82. Lee TP, Moscati R, Park BH. Effects of pesticedes on human leukocyte functions. Res Commun Chem Pathol Pharmakol 23:597-609 (1979)

83. Levy GA, Chisari FV. The immunopathogenesis of chronic HBV induced liver disease. Springer Seminar Immunpathol 3:439-59 (1981)

84. Mac Sween RNM, Thomas MA. Lymphocyte transformation by phytohemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (PPD) in primary biliary cirrhosis. Clin Exp Immunol 15:523-33 (1973)

85. Maisch B, Schuff-Werner P, Berg PA, Kochsiek K. Clinical significance of immunopathological findings in patients with post-pericardiotomy syndrome. II. The significance of serum inhibition and rosette inhibitory factors. Clin Exp Immunol 38:198-203 (1979)

86. Manolepszy J, Kraus-Filarska M, Szeliga W, Litwa M, Panaszek B. Effect of histamine on the spontaneous E rosette formation after blockade of histamine H2 receptors with cimetidine. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 28:891-4 (1980)

87. Marcus ZH, Hess EV, Hermann JH, Trojano P,

Freisheim J. In vitro studies in reproductive immunology. 2. Demonstration of the inhibitory effect of male gentital tract constituents on PHA-stimulated mitogenesis and E-rosette formation of human lymphocytes. J Reprod Immunol 1:97-107 (1979)

88. Meier KP. Hepatitis - Hepatitisfolgen Thieme-Verlag, Stuttgart, 1981, S. 3f

88a. Meyer zum Büschenfelde KB, Miescher PA. Liver specific antigens. Purification and characterization. Clin Exp Immunol 10:89-98

89. Morton H, Rolfe B, Clunie GJ. An early pregnancy factor detected in human serum by the rosette inhibition test. Lancet 1 (8008):394-7 (1977)

90. Müller P, Fellin R, Lambrecht J, Agostini B, Wieland H, Rost W, Seidel D. Hypertriglyceridemia secondary to liver disease. Europ J Clin Invest 4:419-28 (1974)

91. Nakao M, Mizoguchi Y, Manna T, Yamamoto S, Morisawa S. Studies on the subpopulation and function of peripheral lymphocytes, and inhibitor to PHA stimulation existing in the serum of patients with liver disease. Gastroenterol Jap 10:307-15 (1975)

92. Nelson DS, Penrose JM, Waters MFR, Pearson JHM, Nelson M. Depressive effecte of serum from patients with leprosy on mixed lymphocyte reactions. Influence of anti leprosy treatment.

Clin Exp Immunol 22:385-92 (1975)

93. Nelson DS, Gatti RA. Humoral factors influencing lymphocyte transformation. Prog Allergy 21:261- 341 (1976)

94. Newberry WM, Shorey JW, Sanford JP, Combes B. Depression of lymphocytes reactivity to phytohemagglutinin by serum from patients with liver disease. Cell Immunol 6:87-97 (1973)

95. Newble DI, Holmes KT, Wangel AG, Forbes IJ. Immune reactions in acute viral hepatitis. Clin Exp Immunol 2o:17-28 (1975)

96. Okuda N, Moriya N, Mirawaki T, Nagoaki T, Kato E. Blocking effects of human T lymphocyte extracts on E-rosette inhibition by sheep red cell fragments. Clin Immunol Immunpathol 7:372-8 (1977)

97. Pang GT, Wiggins PM, Wilson JD. Nature of the union between sheep red blood cells and T lymphocytes. Int Arch Allergy and Appl Immunol 51:751-6 (1976)

98. Perillo RP, Lewis J, Campbell C, Mc Grath I. Rosette inhibitory factor (RIF) and serum cholylglycine (CG) in the assessment of disease activity in subjects with chronic hepatitis B. Abstract 32a Gastroenterology 77 (1980)

99. Perillo P, Campbell P, Lewis I, Mc Dermott RP. Rosette inhibitory factor (RIF) in serologic subpopulations with chronic hepatitis B virus

(HBV) infections. Abstract 32, Gastroenterology 77 (1980)

100. Peterson DA, Deinhardt FW, Wolfe LG, Johnson DR, Hall WT, Froesner GG. Virus excretion, antibody development and changes in rosette formation of lymphocytes during Non-B hepatitis in marmosets. Prim Med 10: 280-7 (1978)

101. Petri I, Kaiser G, Horvath P, Petri G. Cellular immune functions in patients with cancer of the upper part of the gastrointestinal tract. Acta Chir Acad Sci Hung 21:145-56 (1980)

103. Pozilli P, Di Maro U, Javicoli M, Menzinger G, Andreani D. Inhibition of allogeneic lymphocyte E-rosettes induced by sera from newly diagnosed type I diabetics. Acta Endocrinol (Copenh) 93: 49-53 (1980)

104. Price CD, Davies B, Williams WJ. A search for thymus (T) lymphocyte inhibitory factors in sarcoid sera. Z Erkr Atmungsorgane 149:253-8 (1977)

105. Raptopoulou-Gigi M, Kyriakopoulos G, Goulis G. Serum inhibitory factors and E rosettes in chronic renal failure. Thymus 1:281-5 (1980)

106. Renau-Piquera J, Cervera J. Alterations of the cell surface morphology in human T-rosetting lymphocytes. Acta Haemat 62:185-90 (1979)

107. Robbins E, Marcus PI. Dynamics of acridine orange cell interaction I. Interrelationship of acridine orange particles and cytoplasmic

reddening. J Cell Biol 18:237-50 (1963)

108. Routenberg JA, Dienstag JL, Harrison WO, Kilpatrick ME, Hooper RR, Chisari FV, Purcell RH, Fornes MF. Foodborne outbreak of hepatitis A: Clinical and laboratory featurs of acute and protracted illness. Am J Med Sci 278:123-37 (1979)

109. Rhyhaenen P. Lidocaine inhibition of rosette formation. Med Biol 57:196-8 (1979)

110. Salerno F, Fargion SR, Cappellini MD, Fiorelli G, Dioguardi N. Rosette inhibition test in chronic liver disease. J Clin Pathol 29:778-81 (1976)

112. Sawanobri S, Ashman RB, Nahmias AJ, Benigno BB, Lavia MF. Rosette formation and inhibition in cervical dysplasia and carcinoma in situ. Cancer Res 37:4432-5 (1977)

112a. Seidel D, Greten H, Geisen HP, Wengeler H, Wieland H. Further aspects on the characterisation of high and very low density lipoproteins in patients with liver disease. Europ J Clin Invest 2:359 (1972)

113. Seinen W, Vos JG, Brands R, Hooykaas H. Lymphocytotoxicity and and immunosuppression by organotin compounds. Suppression of graft-versus-host reactivity, blast transformation, and E-rosette formation by di-n-butilindichloride and di-n-octyltindichloride. Immunopharmacology 1:343-55 (1979)

114. Sergott RC, Felberg NT, Savino PJ, Blizzard JJ, Schatz NJ. E-rosette formation in Graves' ophthalmopathy. Invest Ophtalmol Vis Sci 18:1245-51 (1979)

115. Shore A, Limatibul S, Dosch HM, Gelfand EW. Identification of two serum components regulating the expression of T-lymphocyte function in childhood myasthenia gravis. N Engl J Med 301:625-9 (1979)

116. Shohat B, Klein A, Kaufmann H, Blum I, Chowers I. T lymphocytes and plasma inhibitory factor in ACTH-dependant Cushing's patients. Clin Immunol Immunpathol 13:452-61 (1979)

118. Shukla HS, Whitehead RH, Hughes LE. Significance of tumor mass on T-lymphocyte levels in patients with gastrointestinal cancer. Gut 20:660-5 (1979)

119. Skibinski G, Zwolinski J, Wieczorek Z. Partial characterization of a factor present in normal human and animal serum which stimulates E rosette formation by lymphocytes from tuberculous patients. Arch Immunol Ther Exp (warsz) 25:79-85 (1977)

120. Skibinski G, Wieczorek Z, Zwolinski J. Modulation of human T lymphocyte rosette formation by serum factors. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 26 351-6 (1978)

121. Skibinski G, Zwolinski J, Wieczorek Z. Modulation of E rosette forming activity of human lymphocytes by rosette inhibiting factor

(RIF) and rosette restoring factor (RRF). Arch immunol Ther Exp (Warsz) 27:475-80 (1979)

122. Skibinski G, Wieczorek Z, Zwolinski J. Regulatory factors in human serum: effect on murine T cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 29:9-19 (1981)

123. Skrede S, Blomhoff JP, Gjone E, Biochemical features of acute and chronic hepatitis. Ann Clin Res 8:182-99 (1976)

124. Streuli RA, Chung J, Scanu AM, Yachnin S. Inhibition of human lymphocyte E-rosette formation by oxygenated sterols. J Immunol 123:2897-902 (1979)

125. Surrenti C, Casini A, Ramarli D. Effect of serum from patients with cholostasis on the lymphocyte E-rosette formation and on lymphocyte reactivity to phytohemagglutinin. Abstract 221, 13. Meeting of EASL (1978)

126. Surrenti C, Casini A, Ramarli D. Effect of bile acids on E rosette formation and PHA stimulation. Boll Ist Sieroter Milan 59:133-7 (1980)

127. Surrenti C, Ramarli D, Casini A, Scartabelli S, Campi P, Fani A, Nieri S. Studies of cell mediated immunity in patients with Crohn´s disease. Hepatogastroenterology 28:157-9 (1981)

128. Swain A, Trounce JR. Rosette formation in Hodgekin's disease. Oncology 30:449-57 (1974)

129. Thomas HC, De Villiers D, Potter B, Hodgson H, Jain S, Jewell DP, Sherlock S. Immune complexes in acute and chronic liver disease. Clin Exp Immunol 31:150-7 (1978)

130. Tomizawa S, Suzuki S, Oguri M, Kuroume T. Studies of T lymphocyte function and inhibitory factors in minimal change nephrotic syndrome. Nephron 24:179-82 (1979)

131. Tremolada F, Fattowich G, Angi M, Rude L, Realdi R. Lymphocyte function and serum factors in HBsAg positive acute (AH) and chronic active (CAH and in chronic healthy carriers (CHC). in 12. meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL), Hrsg. Karger, Basel) Abstract No. 261 (1977)

132. Usinger WR, Splitter GA. Two molecularly independant surface receptors identify bovine T lymphocytes. J Immunol Methods 45:209-19 (1981)

133. Valdimarsson H, Mc Guire RL. Crude transfer factor preparations stimulate trypsinized human lymphocytes to form rosettes with sheep red cells. Clin Exp Immunol 29:261-5 (1977)

134. Verhaegen H, De Cock W, De Cree J, Goldstein G. Comparison of the in vitro effects of thymopoetin pentapeptide and levamisole on peripheral E-rosette forming cells. Thymus 1:195-204 (1980)

135. West WH, Boozer RB. Low affinity E-rosette formation by the human K-cell. J Immunol 120:

1573-6 (1977)

136. Whitehead RH, Roberts GP, Thatcher J, Teasdale C, Hughes LE. Masking of receptors for sheep erythrocytes on human T-lymphocytes by sera from breast cancer patients. J Natl Cancer Inst 58:1573-6 (1977)

137. Whitehead RH, Roberts GP, Hughes LE, Thatcher J. Importance of methodology in demonstrating depression of T-lymphocyte levels. Br J Cancer 37:28-32 (1978)

138. Wieczorek Z, Skibinski G, Zwolisnki J. Characterization of lymphocyte E rosette inhibitory factor in sera from tuberculous patients. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 25:63-8 (1977)

139. Wieczorek Z, Skibinski G, Zwolinski J. In vitro response to rosette inhibition factor (RIF) and rosette restoring factor (RRF) of human lymphocytes after fractionization on a discontinous density albumin gradient. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 27:481-6 (1979)

142. Wybran J, Govaerts A, Fudenberg H. Differential effect of vinblastin and cholchicine on human active and total T-rosettes. Int Arch Allergy Appl Immunol 55:148-51 (1977)

143. Yambe H, Ishii Y, Kikuchi K, Jimbow K. E-rosette inhibitory factor in sera from patients with mycosis fungoides. J Invest Dermatol 76:376-80 (1981)

144. Yokohama H, Umeda T, Kobayashi K, Akaza H, Niijima T. Restoration of E-rosette formation by bestatin in patients with bladder cancer. J Cancer Res Clin Oncol 98:195-201 (1980)

145. Young GP, Dudley FJ, van der Weyden MB. Suppressive effect of alcoholic liver disease sera on lymphocyte transformation. Gut 20:833-9 (1979)

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei immunsuppressive Serumfaktoren, Rosetteninhibitionsfaktor (RIF) und Seruminhibitionsfaktor (SIF) wurden verlaufsmässig in Seren von Patienten mit akuter Virushepatitis (AVH) sowie (Einzelbestimmungen) bei chronischen Hepatitiden und anderen Leberkrankheiten untersucht. Es wurde eine gute Übereinstimmung des Verlaufs der Aktivität von RIF, SIF sowie biochemischen und virologischen Parametern bei 27 von 3o Patienten mit AVH gefunden. Bei 25 Patienten normalisierten sich sämtliche Parameter innerhalb des Beobachtungszeitraums vollständig. Bei 2 Patienten entwickelte sich eine protrahierte oder chronische Hepatitis, die Transaminasen blieben erhöht, quantitativ gemessenes HBsAg fiel nicht ab und beide immunsuppressive Faktoren blieben nachweisbar. Bei 2 Patienten heilte die Krankheit klinisch und biochemisch aus, HBsAg fiel regelrecht ab und wurde eliminiert, jeweils einer der immunsuppressiven Faktoren blieb jedoch erhöht (falsch positiv). Bei einem Patienten verschwanden beide Faktoren, trotz Anhalt für eine persistierende Hepatitis (falsch negativ). Bei 26 Patienten mit chronisch persistierender Hepatitis (CPH) wurde RIF nur in 3 Fällen gefunden gegenüber 70 von 101 Patienten mit chronisch aggressiver Hepatitis (CAH). Dagegen ging SIF mit der histologischen Aktivität kaum parallel: der Faktor wurde bei 7 von 26 CPH sowie bei 32 von 78 CAH-Patienten gefunden. Die SIF-Aktivität war durchschnittlich höher in HBsAg und HBeAg positiven Seren. Bei RIF zeigte sich keine Korrelation mit virologischen Markern. Während SIF bei anderen infektiösen und autoimmunen Krankheiten gefunden wurde, fand sich RIF nur bei Leberkrankheiten. RIF wurde in der Betalipoproteinfraktion des Serums nachgewiesen und liess sich durch isopyknische Dichtegradien-

tenultrazentrifugation leicht von SIF trennen. Beide Faktoren können zur Verlaufsbeurteilung akuter Hepatitiden beitragen. RIF erscheint spezifischer als SIF und ist zur Beurteilung der Krankheitsaktivität bei chronischen Hepatitiden geeigneter. SIF scheint in Beziehung zur Immunantwort zu stehen; das Auftreten von RIF scheint mit der Schädigung von Hepatozyten zusammenzuhängen. Das Vorkommen E-Rosetteninhibierender Serumfaktoren bei anderen Krankheiten wird diskutiert.

8. LEBENSLAUF

Geboren am 7. September 1951 in Reutlingen als Sohn des Diplomlandwirts Wolfgang Martin Grauer und der Margarete Christine Grauer, geb. Grießhaber, habe ich, Wolfgang Grauer, einen 5 Jahre jüngeren Bruder. Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Grundschule in Riedlingen (Württemberg), und das dortige Gymnasium bis 1966. Anschliessend Besuch des Friedrich List Gymnasiums Reutlingen und Abitur 1970.

Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1970 an der Universität Tübingen. Im März 1971 Aufnahme als Stipendiat in die Studienstiftung des Deutschen Volkes. Physikum 4/1973.

Zum Wintersemester 1973/74 Wechsel an die Universität Freiburg. Medizinisches Staatsexamen bestanden am 6. Juli 1976.

9/1976 bis 8/1977 mit Hilfe eines Auslandsstipendiums der Studienstiftung des deutschen Volkes als Postgraduate Student an der Royal Postgraduate Medical School (RPMS), Hammersmith Hospital, London. Hier an den Abteilungen für Nephrologie (Prof. D.K. Peters), Kardiologie (Prof. J. Goodwin), Rheumatologie (Dr. G.R.V. Hughes) und Neurologie (Dr. C. Pallis) tätig.

9 - 12/1977 als Medizinalassistent an der chirurgischen Abteilung des Marienhospitals Stuttgart (Prof. E. Kraft), 1 - 5/1978 an der inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Reutlingen.

5/1978 - 8/1979 experimentelle Arbeit mit Hilfe eines Promotionsstipendiums der Studienstiftung über immunsuppressive Serumfaktoren bei Virushepatitis an der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, unter

der Leitung von Prof. P.A. Berg.
Erlernen der Programmiersprachen Fortran und Basic sowie der Grundlagen der Systemanalyse (Rechenzentrum der Universität, Technische Hochschule Reutlingen).

9 - 12/1980 restliche Medizinalassistenzzeit an der Abteilung IV der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Prof. M. Eggstein).
1/1980 - 3/1981 Militärdienst als Truppenarzt in Nagold. Während dieser Zeit Weiterarbeit über immunsuppressive Serumfaktoren.

Seit 9/1981 Wissenschaftlicher Angestellter an der Abteilung I der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen (Prof. W. Dölle).

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45